



Diana Catarina Parente Meixedo

Estudo da potencial utilização como agente de contraste em Imagem por Ressonância Magnética de novos magnetolipossomas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora : Doutora Alexandra Maria Fonseca Castelo Dias
de Carvalho, Investigadora, Universidade Nova
de Lisboa

Co-orientador : Doutor António Gabriel Malagueta Feio, Professor
Associado, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Maria Adelaide de Almeida Pedro de Jesus, Professora
Catedrática da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universi-
dade Nova de Lisboa

Arguente: Doutor Mário António Basto Forjaz Secca, Professor Associado
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro, 2012

Estudo da potencial utilização como agente de contraste em Imagem por Ressonância Magnética de novos magnetolipossomas

Copyright © Diana Catarina Parente Meixedo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais e irmã, por serem o meu exemplo de vida

Agradecimentos

Os meus mais profundos agradecimentos,

Aos meus orientadores, Dra. Alexandra Carvalho e Dr. Gabriel Feio, por todo o incansável apoio, empenho, incentivo, dedicação e disponibilidade que me foram prestando ao longo deste semestre e pelos ensinamentos teóricos e experimentais sem os quais não seria possível a conclusão desta dissertação.

À Dra. Maria Clara Gonçalves e ao Dr. Luís Fortes pela disponibilidade e ajuda que me prestaram no Instituto Superior Técnico.

À Dra. Maria Bárbara Martins, Dra. Maria Luísa Corvo, e à aluna Filipa Fontes pela amabilidade e disponibilidade com que me receberam na Unidade de "Novas Formas de Agentes Bioativos", da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, e por todos os ensinamentos que me transmitiram.

Ao Dr. Mário Secca pelos conselhos transmitidos relativamente à entrega definitiva da dissertação.

Ao CENIMAT pelas condições de trabalho proporcionadas.

Aos meus pais, Domingos e Rosa, e irmã, Sofia, por todo o apoio e motivação que me transmitiram e por tudo o que me ensinaram. Obrigada por estarem sempre comigo.

Ao meu namorado João, por estar sempre do meu lado, por todo o carinho, compreensão, por acreditar sempre em mim (mesmo quando nem eu acredito), e por toda a motivação que me transmite.

A toda a minha família, em especial à Mimi, ao Rui, ao Titi, ao João e à minha avó por todo o carinho, e palavras de encorajamento.

Ao meu avô, que mesmo estando longe, está sempre presente.

À Ju, a melhor companheira de "luta" que podia ter nestes últimos cinco anos. Obrigada por toda a amizade, por todos os momentos e por todas as palavras.

À Xica e à Peixinho, por toda a amizade, motivação e bons momentos que passei.

À D. Ana e ao Sr. João por tudo o que fizeram por mim e por todo o carinho que me deram nestes últimos tempos.

E a todas as pessoas que estão sempre presentes na minha vida, o meu mais profundo agradecimento.

Resumo

A Ressonância Magnética Nuclear é largamente utilizada como método de diagnóstico clínico na sua vertente de Imagem por Ressonância Magnética (IRM). Para melhorar o contraste numa imagem de IRM adicionam-se frequentemente substâncias por administração intravenosa, denominadas Agentes de Contraste (AC's). Estes reduzem os tempos T1 e T2 característicos da amostra/tecido/órgão, classificando-se como positivos ou negativos consoante o efeito que produzem na imagem. Este trabalho desenvolveu-se na temática dos AC's para IRM, negativos, constituídos por nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas encapsuladas em lipossomas: magnetolipossomas.

Na primeira parte do trabalho sintetizaram-se magnetolipossomas com diferentes razões molares de fosfatidilcolina de soja e colesterol, estudando-se a sua relaxividade, ou seja, a eficiência como AC. O Colesterol é frequentemente adicionado para melhorar a estabilidade da vesícula em aplicações por administração intravenosa. Nas composições estudadas, verificou-se um efeito desprezável destes magnetolipossomas sobre T1 e uma forte diminuição de T2, o comportamento esperado para um AC negativo. Verificou-se também acentuada dependência da eficiência como AC na quantidade de colesterol na composição do lipossoma. Pensa-se que este efeito dever-se-á a uma diferenciada troca de água entre o exterior e interior do lipossoma. O estudo efetuou-se por Espetroscopia de RMN e por IRM, obtendo-se resultados concordantes.

Na segunda parte estudou-se o efeito de magnetolipossomas de longo período de circulação na corrente sanguínea (ML'sC) na melhoria da qualidade de imagens por IRM de órgãos de animais sujeitos a isquemia hepática, tentando recriar-se o dano mínimo existente num transplante hepático. As imagens foram obtidas por microscopia de IRM num campo magnético de 7T. Distinguiram-se mais estruturas e houve melhoria no contraste, comprovadas por uma avaliação quantitativa da qualidade das imagens. Os ML'sC diminuíam os tempos de relaxação dos tecidos normais, permitindo assim melhor distinção dos tecidos inflamados. Comprovou-se a potencial utilização como AC destes magnetolipossomas em caso de isquemia hepática.

Palavras- Chave: Imagem por Ressonância Magnética, Agente de Contraste, Magnetolipossoma, Relaxividade, Isquemia hepática

Abstract

Nuclear Magnetic Resonance is widely used as a clinical diagnosis method in Magnetic Resonance Imaging (MRI) form. To enhance the image contrast in MRI, substances are often added using venous administration - the Contrast Agents (CA). They reduce T1 and T2 times characteristics of the sample/tissue/organ, being classified as positive or negative depending on their effect on the image. This work was developed in the area for negative CA for MRI, consisting of nanoparticles of superparamagnetic iron oxide encapsulated in liposomes: magnetoliposomes.

In the first part of this work, magnetoliposomes were synthesized with different molar ratios of soybean phosphatidylcholine and cholesterol. Their relaxivity was studied, i.e. its efficiency as CA. Cholesterol is often added to improve vesicle stability in applications for intravenous administration. In the studied compositions, there was a negligible effect in T1 and a strong decrease in T2, the behavior expected for a negative CA. A strong dependence of CA efficiency with the amount of cholesterol in their composition was also verified. This effect can be due to differences in water exchange between the interior and exterior of the liposome. This study was carried out by NMR spectroscopy and MRI, and the results obtained were concordant.

In the second part, it was studied the effect of magnetoliposomes with long circulation time in the bloodstream (ML'sC) in improving the quality of images by MRI. It were studied animal's organs with hepatic ischemia, attempting to recreate the minimum damage on a liver transplant. The images were obtained using MRI microscopy in a magnetic field of 7T. With a quantitative study of image's quality more structures were detected and an improvement in contrast was obtained. ML'sC decrease the relaxation times of normal tissues, thus allowing better distinction of inflamed tissues, showing its potential as CA in case of hepatic ischemia.

Keywords: Magnetic Resonance Imaging, Contrast Agent, Magnetoliposome, Relaxivity, Hepatic Ischemia

Índice de Matérias

1	Enquadramento	1
2	Introdução	3
2.1	Ressonância Magnética Nuclear	3
2.1.1	Conceitos Fundamentais	3
2.1.2	A origem do sinal de RMN	5
2.1.2.1	Relaxação Longitudinal-T1	6
2.1.2.2	Relaxação Transversal-T2	6
2.1.3	FID (Decaimento Livre da Indução)	7
2.1.4	Espectroscopia de RMN	8
2.1.5	Construção da imagem	10
2.2	Agentes de Contraste em IRM	12
2.2.1	Comportamento Magnético	12
2.2.1.1	Agentes de Contraste Paramagnéticos	12
2.2.1.2	Agentes de Contraste Superparamagnéticos	13
2.2.2	Efeito na Imagem	14
2.2.3	Biodistribuição	16
2.2.3.1	Agentes de Contraste de Fluídos Extracelulares (ECF)	16
2.2.3.2	Agentes de Contraste Intravasculares	17
2.2.3.3	Agentes de Contraste Específicos para órgãos ou tecidos	17
2.2.4	Magnetolipossomas	17
2.2.4.1	Lipossomas	18
2.2.4.2	Nanopartículas de Magnetite	19
3	Procedimento Experimental	21
3.1	Materiais e Métodos para o estudo da relaxividade de ML's SPC:Chol	21
3.1.1	Síntese do Ferrofluido	21
3.1.2	Síntese dos ML's SPC:Chol	24
3.1.3	Preparação de soluções para estudo da relaxividade dos ML's SPC:Chol	28

3.1.4	Protocolo para medição de T1 e T2 por Espectroscopia de RMN . . .	28
3.2	Materiais e Métodos para o estudo do comportamento de ML's C, por IRM, em órgãos	30
3.2.1	Preparação do órgão em estudo	30
3.2.2	Protocolo para obtenção de imagens, por IRM, em órgãos	31
3.2.3	Protocolo para determinação de T2 por Eco de Spin múltiplo com 8 ecos	34
4	Resultados e Discussão	35
4.1	Estudo da Relaxividade dos ML's SPC:Chol	35
4.1.1	Determinação da Relaxividade Longitudinal por Espectroscopia de RMN	36
4.1.2	Determinação da Relaxividade Transversal por Espectroscopia de RMN	39
4.1.3	Potencial utilização como Agente de Contraste	42
4.2	Estudo do comportamento de magnetolipossomas, por IRM, em órgãos . .	45
4.2.1	Estudo de casos com isquemia hepática por IRM	46
4.2.1.1	Avaliação da qualidade das imagens	49
4.2.1.2	Comparação com os casos C e D	56
4.2.1.3	Determinação de T2 por Eco de Spin múltiplo com 8 ecos	62
4.2.1.4	Potencial utilização como Agente de Contraste em caso de isquemia hepática	63
4.2.2	Estudo de caso em órgão normal, por IRM	64
4.2.2.1	Avaliação da qualidade das imagens	66
4.2.2.2	Potencial utilização como Agente de Contraste em casos de órgãos normais	69
5	Conclusões e Perspectivas Futuras	71
6	Anexos	79
A	ROI's seleccionadas	81

Índice de Figuras

2.1	Alteração da magnetização nuclear dos spins após a aplicação do pulso de RF	5
2.2	Retorno da magnetização longitudinal	6
2.3	Decaimento da magnetização transversal	7
2.4	Sinal de FID gerado após a aplicação de pulso de RF de 90°	8
2.5	Estrutura Molecular da Fosfatidicolina de Soja, em que R representa uma cadeia longa de ácidos gordos	18
2.6	Estrutura da magnetite	20
3.1	Ferrofluido obtido	22
3.2	Diagrama representativo do procedimento experimental para a síntese do ferrofluido	23
3.3	Filme de lípidos obtido	24
3.4	Extrusor	25
3.5	Coluna de Cromatografia	26
3.6	Esquema representativo dos ML's SPC:Chol	26
3.7	Diagrama representativo do procedimento experimental para a síntese dos ML's SPC:Chol	27
3.8	Sistema do magneto à esquerda, e consola do operador e do hardware electrónico à direita	28
3.9	Diagrama ilustrativo da sequência de Inversão Recuperação	29
3.10	Figado de Rato (A) Vista anterior, (B) Vista inferior (visceral), em que SHVC corresponde à veia cava supra hepática, e IVC à veia cava inferior	32
3.11	Anatomia das veias hepáticas (A), veia porta hepática (B) e sistema biliar (C) no rato	32
3.12	Diagrama representativo do procedimento de imagem FLASH	33
4.1	Taxa de relaxação Longitudinal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0	37

4.2	Taxa de relaxação Longitudinal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0.5	38
4.3	Taxa de relaxação Longitudinal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:1	38
4.4	Taxa de relaxação Transversal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0	40
4.5	Taxa de relaxação Transversal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0.5	41
4.6	Taxa de relaxação Transversal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:1	41
4.7	Relaxividade Transversal em função da razão molar SPC:Chol	43
4.8	Imagem obtida por IRM para o caso A, corte 8	47
4.9	Imagem obtida por IRM para o caso A, corte 9	47
4.10	Imagem obtida por IRM para o caso A, corte 10	47
4.11	Imagem obtida por IRM para o caso B, corte 8	48
4.12	Imagem obtida por IRM para o caso B, corte 9	48
4.13	Imagem obtida por IRM para o caso B, corte 10	48
4.14	Representação gráfica do número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo	50
4.15	Representação gráfica do Contraste médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo	52
4.16	Representação gráfica do CNR médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo	54
4.17	Representação gráfica do SNR médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo	55
4.18	Imagem obtida por IRM para o caso C, corte 8	56
4.19	Imagem obtida por IRM para o caso C, corte 9	56
4.20	Imagem obtida por IRM para o caso C, corte 10	56
4.21	Imagem obtida por IRM para o caso D, corte 8	57
4.22	Imagem obtida por IRM para o caso D, corte 9	57
4.23	Imagem obtida por IRM para o caso D, corte 10	57
4.24	Comparação do nº de Zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática	58
4.25	Comparação do Contraste médio entre zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática	60
4.26	Comparação de CNR médio, para as ROI selecionadas, nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática	61

4.27	Comparação de SNR médio, para as ROI selecionadas, nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática	62
4.28	Imagem obtida por IRM para o caso E, corte 8	65
4.29	Imagem obtida por IRM para o caso E, corte 9	65
4.30	Imagem obtida por IRM para o caso E, corte 10	65
4.31	Comparação do nº de Zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para todos os casos em estudo	66
4.32	Comparação do Contraste médio entre zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os todos os casos em estudo . . .	67
4.33	Representação gráfica do CNR médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nos diferentes casos em estudo	68
4.34	Comparação de SNR médio, para as ROI selecionadas, nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os diferentes casos em estudo	69
A.1	ROI no caso A, corte 8, 9 e 10 respectivamente	81
A.2	ROI no caso B, corte 8, 9 e 10 respectivamente	81
A.3	ROI no caso C, corte 8, 9 e 10 respectivamente	82
A.4	ROI no caso D, corte 8, 9 e 10 respectivamente	82
A.5	ROI no caso E, corte 8, 9 e 10 respectivamente	82

Índice de Tabelas

2.1	Valores das relaxividades para nanopartículas, referidos em estudos publicados, expressos em $mM^{-1}s^{-1}$	16
3.1	Razão molar SPC:Colesterol das amostras	24
3.2	Quantidades de SPC e Colesterol em gramas	24
3.3	Quantidades de Fe_3O_4 em g e água em mL	25
4.1	Valores das concentrações das diferentes amostras após diluições	36
4.2	Resultados obtidos para a constante T1 das diferentes amostras	36
4.3	Resultados obtidos para a constante T2 das diferentes amostras	39
4.4	Resultados obtidos para r2 das diferentes amostras	42
4.5	Comparação de relaxividades de nanopartículas semelhantes, já estudadas, com as da presente dissertação	44
4.6	Número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo	49
4.7	Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso A, nos cortes em estudo	51
4.8	Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso B, nos cortes em estudo	51
4.9	Valores de σ_0 nos casos A e B, nos cortes em estudo	52
4.10	CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso A, nos cortes em estudo	53
4.11	CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso B, nos cortes em estudo	53
4.12	SNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo	55
4.13	Número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos C e D, nos cortes em estudo	58

4.14	Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso C, nos cortes em estudo	59
4.15	Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso D, nos cortes em estudo	59
4.16	Valores de σ_0 nos casos C e D, nos cortes em estudo	60
4.17	CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso C, nos cortes em estudo	60
4.18	CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso D, nos cortes em estudo	61
4.19	SNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos C e D, nos cortes em estudo	62
4.20	Valor obtido para T2 por imagem para os casos em estudo	63
4.21	Número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo	66
4.22	Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo	67
4.23	Valores de σ_0 no caso E, nos cortes em estudo	67
4.24	CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo	68
4.25	SNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo	68

Lista de Abreviaturas e Siglas

AC - Agente de Contraste

CENIMAT/i3N - Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Chol- Colesterol

$(CH)_34NOH$ - Hidróxido de tetrametilamónio

CNR - Razão contraste-ruído

CPMG - Sequência de impulso Carr-Purcel-Meiboom-Gill

DLS - *Dynamic Light Scattering*

ECF - Agentes de Contraste de Fluídos Extracelulares

EPC- Fosfatidicolina de ovo

Fe^{2+} - Ferro(II)

Fe^{3+} - Ferro(III)

$FeCl_24H_2O$ - Cloreto Férrico (II) tetrahidratado

$FeCl_36H_2O$ - Cloreto Férrico (III) hexahidratado

FID - Decaimento livre da indução

Fe_2O_3 - Magmite

Fe_3O_4 - Magnetite

FLASH- Sequência *Fast Low Angle Shot*

FOV - *Field of view*

Gd 3+ - Ião gadolínio trivalente

Hcl - Ácido Clorídrico

H_2O_2 - Peróxido de Hidrogénio

ICP - *Inductively Coupled Plasma*

IRM - Imagem por Ressonância Magnética

IST - Instituto Superior Técnico

LUV - *Large unilamellar vesicles*

ML - Magnetolipossoma

ML C - ML's com núcleo magnético de magnetite revestido com PEG, e encapsuladas em SPC, possuindo na bicamada ligações a polímeros de PEG

ML SPC:Chol - ML's com núcleo magnético de magnetite encapsulado em SPC , diferenciando entre si pela quantidade de Colesterol presente na sua bicamada

Mn^{2+} - Manganésio

MPIO - *Mícro-sizer particles of iron oxide*

PEG - Polietileno glicol

r1 - Relaxividade Longitudinal

R1 - Relaxação Longitudinal

r2 - Relaxividade Transversal

R2 - Relaxação Transversal

RF - Radiofrequência

RM - Ressonância Magnética

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RML - Lobo médio direito (do fígado)

ROI - Região de interesse

SNR - Razão sinal-ruído

SPIO - *Small particles Sof iron oxide*

SPC - Fosfatildicolina de soja

SPM - Partícula Superparamagnética

SUV - *Small unilamellar vesicles*

TE - Tempo de eco

TI - Tempo de inversão

TR - Tempo de repetição

T1- Constante de relaxação longitudinal

T2 - Constante de relaxação transversal

$T2_{heterogeneidades}$ - Tempo de relaxação devido às heterogeneidades do campo externo

USPIO - *Ultra-small paramagnetic iron oxide particles*

UV - Ultra Violeta

Lista de Símbolos

T - Tesla

$\vec{\mu}$ - Momento magnético nuclear

\vec{B}_0 - Campo magnético externo, estacionário e homogêneo

h - Constante de Planck

l - Intensidade do spin

m_l - Projeção do spin

γ - Razão giromagnética

ν_0 - Frequência de Larmor

$n \uparrow$ e $n \downarrow$ - Estados de energia (paralelo e antiparalelo)

ΔE - Diferença de estados de energia

k - Constante de Boltzmann

T - Temperatura

M_z - Magnetização nuclear longitudinal

M_{xy} - Magnetização nuclear transversal

σ_j - Constante de blindagem

j - Conjunto de átomos quimicamente equivalentes na molécula

δ_j - Parâmetro para quantificar o desvio químico

M - Magnetização

V - Volume

H - Campo magnético dentro da matéria

K - Constante de anisotropia

τ - Tempo de relaxação de Néel

τ_0 - Fator pré-exponencial

kDa - KiloDalton

mM - mmol/litro ou milimolaridade

mL - Mililitro

g - Grama

mm - Milímetro

min - Minuto

h - Hora

s - Segundo

μs - Microsegundo

ms - Milissegundo

C - Contraste

S - Intensidade do sinal

σ_0 - Intensidade do sinal numa região fora do objeto (sem sinal)



Enquadramento

A imagem por Ressonância Magnética (IRM) é um método de diagnóstico por imagem muito utilizado na prática clínica, que se encontra em constante desenvolvimento. A IRM possui elevada resolução espacial em comparação com outras técnicas de imagem, mas pode tornar-se um pouco limitativa, na medida em que podem não se visualizar todas as estruturas, tecidos ou lesões. Neste contexto, surgem os Agentes de Contraste (AC's) utilizados em IRM, que permitem a redução dos tempos de relaxação T1 e T2, característicos da Ressonância Magnética, melhorando-se assim o contraste das imagens ponderadas em T1 e T2, permitindo uma melhor diferenciação das estruturas presentes, podendo realçar lesões existentes face aos tecidos normais.

O AC mais utilizado tem na sua composição gadolínio, uma substância paramagnética. Os compostos de quelato de gadolínio são os mais utilizados para o efeito, diminuindo o tempo de relaxação T1 dos tecidos e classificando-se, portanto, como agentes positivos. Atualmente têm vindo a ser desenvolvidos e estudados, como potenciais agentes de contraste, diversas partículas superparamagnéticas, como é o caso dos óxidos de ferro. Por darem origem a uma diminuição nos tempos de relaxação T2 e T2*, estes AC's são classificados como negativos. As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro alteram os tempos de relaxação nos órgãos que se pretendem observar, necessitando de doses mais baixas do que as utilizadas para as partículas paramagnéticas, como no caso de quelatos de gadolínio. Os magnetolipossomas, que consistem em lipossomas cujo interior aquoso é ocupado por núcleos de óxido de ferro, são exemplos de potenciais agentes de contraste.

Neste panorama, o presente trabalho surge com o intuito de estudar a potencialidade de magnetolipossomas desenvolvidos como AC em IRM e verificar a sua eficiência nessa aplicação. Tendo em conta este quadro, foram definidos os seguintes objetivos:

- Estudo da eficiência como AC's em IRM de magnetolipossomas desenvolvidos com diferentes formulações, através do estudo da sua relaxividade, por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.
- Estudo da potencial utilização como AC's de magnetolipossomas com longo período de circulação na corrente sanguínea, após a sua injeção num órgão de um rato, através da obtenção e comparação de imagens obtidas do órgão por IRM, e quantificação estatística da melhoria de imagem obtida, em casos de isquemia hepática.

A presente dissertação encontra-se organizada em quatro capítulos. Do primeiro capítulo consta um enquadramento do tema do trabalho, seguida de uma introdução teórica em que se abordam os conceitos base da Ressonância Magnética Nuclear, e noções acerca de Agentes de Contraste, em particular no caso dos magnetolipossomas. Consolidadas as bases teóricas que sustentam o presente trabalho, segue-se o capítulo dois, onde se apresentam, numa primeira parte, os materiais e métodos para a produção dos magnetolipossomas desenvolvidos e para o estudo da sua relaxividade, e, numa segunda parte, os materiais e métodos utilizados no estudo do comportamento de magnetolipossomas em tecidos, através de IRM. No capítulo três apresentam-se os resultados obtidos e a sua discussão. Finalmente, no capítulo quatro, são resumidas as principais conclusões deste trabalho e propostas perspectivas futuras visando a sua continuação.



Introdução

2.1 Ressonância Magnética Nuclear

2.1.1 Conceitos Fundamentais

As partículas subatômicas, tais como prótons, elétrons ou neutrões, possuem um momento angular intrínseco, ou spin, que podemos classicamente fazer corresponder a uma rotação da partícula em torno do seu eixo. No entanto, em muitos átomos, o núcleo não apresenta spin global, \vec{I} , devido à forma como os spins dos nucleões estão emparelhados. Como os núcleos possuem carga, ao spin nuclear está associado um momento magnético nuclear, $\vec{\mu}$, dado pela expressão:

$$\vec{\mu} = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) \vec{I} \quad (2.1)$$

onde γ é a razão giromagnética do núcleo e h a constante de Planck.

As propriedades magnéticas dos núcleos são, por conseguinte, caracterizadas pela intensidade do seu spin, l , e, de acordo com as suas orientações possíveis segundo uma dada direção (por exemplo a de um campo magnético externo \vec{B}_0), pela projeção do spin, m_l , segundo essa direção. Estes valores estão quantificados, podendo l assumir valores nulos, inteiros ou semi-inteiros e, para cada valor de l , podendo m_l tomar $2l + 1$ valores, de $+l$ a $-l$, separados pela unidade.

Na ausência de campos magnéticos aplicados, nenhuma das orientações é privilegiada, possuindo todas a mesma energia e probabilidade. No entanto, considerando uma amostra sob a acção de um campo magnético externo \vec{B}_0 , estacionário e homogêneo, estabelece-se uma interação entre o campo e os núcleos, e as $2l + 1$ orientações do spin de

uma espécie nuclear, na direção do campo, correspondem a diferentes estados de energia, E_{ml} - Efeito de Zeeman. No estado de equilíbrio os núcleos da mesma espécie da amostra vão ocupar os vários estados de energia segundo uma lei de Boltzmann, conferindo um magnetismo nuclear macroscópico à amostra[1].

No caso do hidrogénio, 1H , o núcleo é constituído por um simples protão, com spin $l = 1/2$. Assim, quando um grupo de átomos de hidrogénio se encontra sob a acção de um campo magnético externo, os protões podem alinhar-se paralelamente ou anti paralelamente ao campo principal, nos dois possíveis estados de energia ($m_l = \pm 1/2$), com populações respetivamente (n_{\uparrow} e n_{\downarrow}).

Sob a acção de um campo estacionário, a energia necessária para estimular ou excitar um protão num estado paralelo de baixa energia para um estado antiparalelo de maior energia, pode ser fornecida por uma radiação eletromagnética ν no domínio das radiofrequências (RF), função do núcleo, por intermédio da sua razão giromagnética, e do campo B_0 , através da equação de Larmor:

$$\nu_0 = \frac{\gamma * B_0}{2\pi} \quad (2.2)$$

(a frequência ν_0 corresponde classicamente à frequência de precessão de um dipolo magnético, com o momento magnético do núcleo, no mesmo campo, e é designada por frequência de Larmor).

Uma radiação eletromagnética de RF que incida sobre uma amostra com spins nucleares imersos num campo magnético estacionário elevado, se possuir uma frequência em ressonância com a frequência de Larmor dos núcleos, pode ser absorvida ao excitar transições dos spins nucleares para níveis de energia mais elevados, criando-se uma situação fora de equilíbrio que é, por sua vez, compensada com transições nucleares para estados de energia inferior que pretendem reconstituir a distribuição de equilíbrio de Boltzmann. Este processo é acompanhado por emissão de radiação com exatamente a mesma frequência. Esta emissão constitui o sinal de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), que pode ser detetado, processado e estudado.

Posto isto, é possível compreender o termo “Ressonância Magnética Nuclear” - *Ressonância* devido ao facto da radiação eletromagnética incidente e da frequência de Larmor dos spins nucleares (que podemos visualizar como a frequência de precessão dos spins em torno do campo magnético) terem de ser iguais; *Magnética* pelo facto dos núcleos da amostra em estudo apresentarem um paramagnetismo nuclear sob a acção de um campo magnético externo, homogéneo e estacionário, com origem nas diferenças entre as populações dos níveis de energia dos spins nucleares; e *Nuclear* porque o momento magnético na base desta técnica está associado ao spin nuclear de um núcleo atómico com carga [2].

2.1.2 A origem do sinal de RMN

Consideremos agora apenas uma amostra de Hidrogénio 1H . Em equilíbrio, os prótons, quando sujeitos à acção de um campo estacionário B_0 , encontram-se em maior número no estado de menor energia, do que resulta uma magnetização nuclear longitudinal, M_z , paralela a B_0 , não nula. Por outro lado, precessando os spins de uma forma incoerente perpendicularmente ao plano xy , a magnetização nuclear transversal média, M_{xy} , é nula. A aplicação de um pulso de RF à frequência de ressonância, segundo uma direcção perpendicular a B_0 , tem dois efeitos. Em primeiro lugar, induzindo transições entre os níveis de energia dos prótons, modifica o valor de equilíbrio do magnetismo nuclear longitudinal M_z . Em segundo lugar, por ser aplicado no plano xy (perpendicular a B_0), estimula uma coerência na precessão dos spins no plano horizontal, induzindo o aparecimento de um magnetismo nuclear transversal, M_{xy} , que precessa à frequência de Larmor em torno do eixo dos zz (a direcção de B_0) e, por conseguinte, é perpendicular a M_z . Se o pulso de RF tiver uma forma e uma duração tal que a componente M_z resulte nula e M_{xy} seja máxima, o pulso diz-se de 90° ou $\pi/2$ (efetivamente, a aplicação de um campo de RF de intensidade B_1 segundo uma direcção perpendicular a B_0 tem como efeito a precessão de M_z em torno dessa direcção com a frequência $\nu_1 = \frac{\gamma B_1}{2\pi}$). A figura 2.1 pretende demonstrar de forma esquemática a magnetização dos spins após a aplicação de um pulso de RF de 90° [3]

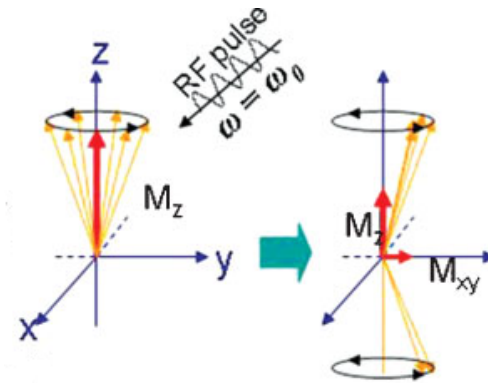


Figura 2.1: Alteração da magnetização nuclear dos spins após a aplicação do pulso de RF

Quando, para o mesmo B_0 , se aplica um pulso com o dobro da duração, designado de 180° ou π , verifica-se um alinhamento anti-paralelo dos prótons, ficando M_z com o valor simétrico (negativo) do valor de equilíbrio, e a componente M_{xy} nula [4].

Quando os pulsos de RF terminam, os núcleos que se encontravam excitados, retornam ao seu estado original de orientação: M_z retoma o seu valor máximo de equilíbrio, paralelo a B_0 , e M_{xy} anula-se. É o fenómeno da Relaxação, longitudinal no primeiro caso, transversal no segundo.

2.1.2.1 Relaxação Longitudinal-T1

Com o retorno dos prótons dos estados energéticos mais elevados (anti-paralelos) para os inferiores (paralelos), M_z retorna ao seu valor de equilíbrio. Essa recuperação ao longo do tempo é exponencial, caracterizada por um tempo de relaxação longitudinal ou spin-rede, T1. Assim, a evolução temporal de M_z , após uma sequência de pulsos que o anule, segue (representado no gráfico da figura 2.2 [5]):

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{(-t/T1)}) \quad (2.3)$$

em que t corresponde ao período de tempo após o instante de excitação, e T1 é o tempo necessário para que M_z retome 63% ($1 - 1/e$) do seu valor inicial M_0 [4].

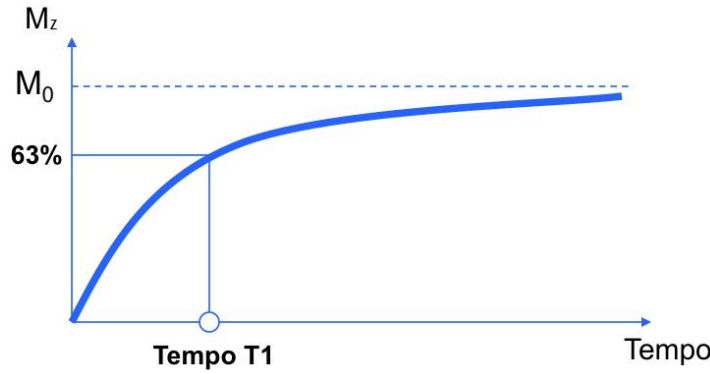


Figura 2.2: Retorno da magnetização longitudinal

2.1.2.2 Relaxação Transversal-T2

Quando o pulso de RF termina, a coerência de fase na precessão do spin dos prótons no plano xy volta a desaparecer, devido às trocas de energia entre si (interação spin-spin), no que resulta um decaimento exponencial para o equilíbrio de M_{xy} , com um tempo característico de relaxação transversal, ou de spin-spin, T2 (que corresponde ao tempo necessário para reduzir M_{xy} a $1/e$ do seu valor imediatamente após a excitação dos prótons pelo pulso de RF). A relaxação da magnetização transversal é descrita pela curva exponencial (representada no gráfico da figura 2.3 [5]):

$$M_{xy}(t) = M_0 * e^{(-t/T2)} \quad (2.4)$$

em que t é o período de tempo após a fase de excitação, correspondendo T2 ao tempo necessário para que a magnetização no plano transversal atinja 37% do seu valor inicial M_0 [4].

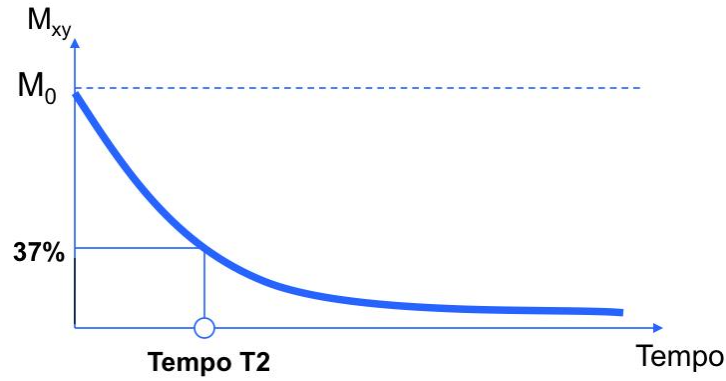


Figura 2.3: Decaimento da magnetização transversal

2.1.3 FID (Decaimento Livre da Indução)

Durante o intervalo de tempo em que a componente transversal M_{xy} do magnetismo nuclear precessa em torno de B_0 , é induzida uma força eletromotriz numa bobina re- cetora que envolve a amostra, de acordo com a Lei de Faraday da indução magnética, podendo ser detetado um sinal de RMN, designado por Decaimento Livre da Indução, ou FID (*Free Induction Decay*). Esta tensão induzida na bobina corresponde a um sinal de onda oscilante sinusoidal ($\sin(\omega t)$) que se reduz em amplitude de forma exponencial com o tempo $e^{(-t/T_2)}$, uma vez que após a aplicação do pulso de RF a componente transversal da magnetização nuclear relaxa para zero. Se o campo magnético estacionário B_0 aplicado fosse totalmente homogêneo, a constante de decaimento seria igual a T_2 , o que não se verifica na prática, pois os campos magnéticos gerados pelos magnetos apresentam sempre algumas heterogeneidades. Na realidade, o envelope FID decai com um tempo de relaxação T_2^* , descrito por:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2_{heterogeneidades}}} \quad (2.5)$$

em que $T_{2_{heterogeneidades}}$ corresponde ao tempo de relaxação devido às heterogenei- dades do campo externo. Assim, o decaimento do sinal de RMN de uma amostra é carac- terizado por dois tempos característicos, um devido às interações spin-spin, localmente originadas pelos momentos magnéticos vizinhos (com o valor T_2), e o outro devido às imperfeições do campo magnético principal B_0 (com o valor $T_{2_{heterogeneidades}}$). O resul- tado final observável é o decaimento exponencial do FID, com o tempo de relaxação T_2^* [1, 4]. A figura 2.4 apresenta o sinal de FID gerado após a aplicação de um pulso de RF de 90° (adaptado de [6]).

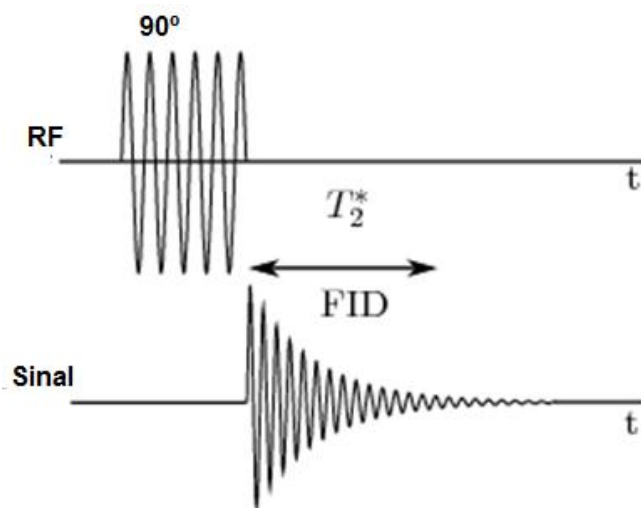


Figura 2.4: Sinal de FID gerado após a aplicação de pulso de RF de 90°

2.1.4 Espectroscopia de RMN

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica muito comum de espectroscopia utilizada para estudo da estrutura e dinâmica molecular pela irradiação dos núcleos atômicos colocados num campo magnético externo intenso e detecção das transições ocorridas.

Podem ser estudados por RMN todas as espécies nucleares com spin não nulo, embora a fraca sensibilidade da técnica apenas torne prática a observação de núcleos abundantes (por exemplo o ^1H) ou covalentemente ligados a núcleos abundantes (o ^{13}C ligado a um ou mais ^1H). A observação de cada espécie nuclear é determinada pela escolha da radiação RF com a frequência de Larmor do núcleo que se pretende excitar. As restantes espécies nucleares não são excitadas pelas frequências da banda passante do pulso em torno da onda portadora com a frequência de ressonância selecionada. Em contrapartida, pequenas variações de frequência do mesmo núcleo, devido a diferentes localizações na configuração molecular, são excitados pela banda passante do pulso.

O FID do sinal de RMN detetado inclui assim todas as frequências associadas aos posicionamentos do mesmo tipo de átomo na configuração molecular, permitindo a elucidação da estrutura da molécula. O FID não contém, no entanto, nenhuma informação sobre a distribuição espacial dos átomos, apenas sobre as ligações e correlações que mantém com a sua vizinhança química.

Para se obter a informação sobre a estrutura molecular é necessário converter o FID de RMN, no domínio do tempo, no espectro de RMN, no domínio da frequência, através de uma Transformação de Fourier.

Em líquidos o espectro de RMN é constituído por um conjunto de bandas, com frequências bem definidas, e que normalmente apresentam uma estrutura fina de multipletos.

Cada banda corresponde à ressonância de átomos quimicamente equivalentes na molécula, e a estrutura fina dá indicação sobre a vizinhança homonuclear ou heteronuclear com os átomos vizinhos. As bandas têm origem em campos locais originados por um fenómeno de blindagem dos núcleos ao campo magnético aplicado, associado à deformação dos orbitais eletrônicos das ligações de covalência. Deste fenómeno resulta um desvio químico (em relação à frequência de Larmor) característico no espectro que identifica aqueles átomos.

Convém assinalar que a espectroscopia de RMN é sensível não aos átomos mas sim aos núcleos, por conseguinte os espectros são relativos a nuclídeos bem definidos e diferentes isótopos comportam-se como entidades diferentes do ponto de vista da RMN. As respetivas ressonâncias podem ser observadas a frequências completamente afastadas (caso do protão, 1H , e do deutério 2H). Em alguns casos um dos isótopos pode não dar origem a qualquer tipo de sinal (caso do ^{13}C , muito estudado em produtos orgânicos, ou o ^{14}C , mais abundante mas que possui momentos angular e magnético nulos e não são observáveis em RMN).

Os desvios químicos são quantitativamente descritos em termos das constantes de blindagem σ_j , que caracterizam a resposta linear dos orbitais moleculares ao campo externo e a forma como essa resposta é sentida pelos núcleos, isto é, como campos locais ΔB , definidos por:

$$\Delta B_{desvio}(j) = (1 - \sigma_j) * B_0 \quad (2.6)$$

em que j identifica conjuntos de átomos quimicamente equivalentes na molécula. A condição de ressonância e a frequência da respetiva banda é dada então por:

$$\nu_j = \frac{\gamma * B_0}{2\pi} * (1 - \sigma_j) \quad (2.7)$$

Quanto mais elevado for o campo aplicado B_0 , mais importante é o desvio químico e maior é a resolução espectral.

O desvio químico é habitualmente quantificado através do parâmetro δ_j , que é definido pelas frequências de ressonância do núcleo de interesse e por um composto de referência (normalmente o TMS para o protão) [7]:

$$\delta_j = 10^6 * \frac{\nu_j - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (2.8)$$

Se a frequência, ou desvio químico, das bandas dá informações sobre os grupos químicos onde os átomos estão inseridos, a área dessa banda é proporcional ao número de átomos que gozam dessa especificidade química. A análise de um espectro de RMN consiste portanto não só em determinar os desvios químicos das bandas como também calcular as suas áreas relativas (mediante o cálculo numérico dos seus integrais).

A qualidade de um espectro RMN, do ponto de vista da sua análise, depende basicamente de dois fatores: a forma das linhas ou bandas espectrais e a sua resolução ou separação. Estes dois fatores estão de algum modo relacionados. Uma melhoria da

qualidade de resolução dos espectros de RMN pode ser obtida intervindo nos seguintes pontos:

- Aumentando a intensidade do campo magnético aplicado, que aumenta os desvios químicos das bandas, separando-as;
- Melhorando a homogeneidade do campo magnético principal, com a utilização de bobinas de *Shim* que compensam as imperfeições do campo externo com pequenos campos induzidos de forma a tornar o campo aplicado (total) mais uniforme no volume da amostra, com consequente estreitamento das bandas (e aumento de $T2^*$);
- Escolher núcleos com spin $1/2$, para evitar as chamadas interações quadrupolares, que alargam as bandas de núcleos com spin superior a esse valor;
- Utilizar amostras líquidas, onde a dinâmica molecular de difusão browniana isotropa anula, em média, as interações tensoriais com estreitamento das bandas espectrais. Em amostras de elevada viscosidade, como é o caso dos tecidos biológicos, as linhas espectrais são sempre largas, o que limita, por exemplo, a possibilidade de se fazer espectroscopia localizada de alta resolução.

O isótopo do Hidrogénio mais utilizado em técnicas de RMN, e em particular, em IRM, é o isótopo 1H , devido ao facto de [8]:

- Ter um spin de $\pm 1/2$ e por conseguinte não ser quadrupolar;
- Ser o isótopo de hidrogénio mais abundante;
- A sua recetividade com relação a um campo aplicado é a maior de todos os núcleos, tornando o núcleo mais facilmente observável em RMN;
- O corpo humano é composto por tecidos que são constituídos fundamentalmente por água e gordura, contendo ambos hidrogénio;
- A molécula de água é pequena e relativamente móvel, o que permite obter sinais com linhas espectrais finas e longos tempos de relaxação transversal (característica útil na imagem para controlar a obtenção de contrastes com a aplicação de Agentes de Contraste apropriados).

2.1.5 Construção da imagem

Em espectroscopia de RMN, uma amostra é colocada sob a acção de um campo magnético e, através das transições induzidas num determinado sistema de spins nucleares, numa molécula, por uma radiação de RF, obtém-se uma informação estrutural sobre a vizinhança química de átomos equivalentes, e respetiva quantidade, que constituem essa molécula, independentemente da posição que ocupam na amostra em estudo.

Em IRM, não é a informação a nível dos desvios químicos (estrutural) que importa, mas sim a informação ao nível da posição, ou seja, importa saber de que ponto no espaço provém cada sinal originado na amostra em estudo.

A construção de imagem envolve a localização dos spins de interesse, excitação dos spins selecionados, codificação espacial do seu sinal, deteção do sinal e reconstrução da imagem.

Para a construção de uma imagem é necessário que haja excitação simultânea de núcleos em planos específicos ou cortes. Estes, uma vez excitados, emitem simultânea e individualmente um sinal, que é coletado sob a forma de uma superposição de ecos, sendo necessária a codificação espacial de cada um, em fase e em frequência, para distinguir e identificar o eco com origem em cada ponto de plano selecionado. Ora, para a obtenção de imagens, cada ponto do corte produz, com efeito, um eco com uma frequência e uma fase características, devido ao facto de os gradientes de campo provocarem:

- numa direção, uma variação de frequência de ressonância do eco, se aplicados por um pulso durante a sua aquisição;
- numa direção perpendicular, variações da fase (na origem) do eco, se aplicados por um pulso previamente à aquisição.

Podem-se assim separar as respostas dos diferentes pontos do corte e reconstruir uma imagem planar de RM (ressonância magnética).

Para haver excitação seletiva de um corte, é necessária a aplicação de um campo de RF na presença de um gradiente de campo magnético na direção de B_0 . Os núcleos em planos paralelos ao longo dessa direção possuem, assim, diferentes frequências de Larmor. Desta forma, após um pulso de excitação RF com uma determinada frequência, apenas os núcleos do corte que apresentem a mesma frequência de Larmor serão excitados. A localização de cada corte ao longo da direção de gradiente depende da frequência da radiação de RF, e a orientação do corte depende da direcção do gradiente do campo magnético, normalmente paralela à direção do campo principal (podem-se também seleccionar cortes oblíquos jogando com combinações dos três gradientes, x, y e z), enquanto a espessura de corte é determinada pela largura do pulso de RF e pela intensidade do gradiente.

Quando o mesmo corte é excitado repetidamente, mantendo, por um lado, constante a intensidade do gradiente de codificação em frequência e, por outro, incrementando sucessivamente o gradiente de codificação em fase, o FID é amostrado em função do tempo de aquisição e das intensidades do gradiente de codificação em fase com a mesma duração (ou do tempo de aplicação do gradiente de codificação em fase se a sua intensidade for constante). Estes dados são digitalizados numa matriz 2D (que constitui o *espaço-k*), e sujeitos a uma Transformação de Fourier bidimensional, permitindo obter a distribuição espacial do sinal de RM no corte através de um mapa de amplitude do sinal, ou seja, a imagem do corte ponderada pela densidade de spins [9].

2.2 Agentes de Contraste em IRM

Em contexto clínico pretende-se de uma imagem de RM que esta tenha a maior informação possível para a obtenção de um diagnóstico o mais fiável possível. A qualidade da imagem em IRM é influenciada por diversos fatores, como o caso da intensidade do campo magnético estacionário e gradientes aplicados, a homogeneidade do campo magnético, o tipo de bobina utilizada, parâmetros para obtenção de imagens como o número de acumulação de sinal, espessura, localização e orientação de cortes, sequências de pulsos de RF e seus parâmetros (tais como TE e TR), agentes de contraste utilizados, entre outros [10].

Quando por vezes o contraste observado numa imagem obtida por IRM não é suficiente, conforme o que se pretende observar na imagem, recorre-se à utilização de agentes de contraste, que permitem a redução dos tempos de relaxação T1 e T2.

Os agentes de contraste (AC's) podem ser classificados de acordo com [11]:

- O Comportamento magnético:
 - Agentes Paramagnéticos
 - Agentes Superparamagnéticos
- Efeito na imagem:
 - Agentes Positivos (predominantemente diminuem T1)
 - Agentes Negativos (predominantemente diminuem T2)
- Biodistribuição:
 - Agentes de Fluídos Extracelulares (ECF)
 - Agentes Intravasculares
 - Agentes Específicos para órgãos ou tecidos

2.2.1 Comportamento Magnético

2.2.1.1 Agentes de Contraste Paramagnéticos

Os AC's paramagnéticos tem na sua composição iões metálicos que possuem um ou mais eletrões desemparelhados, possuindo assim momento magnético permanente. Em solução aquosa, surge uma interação magnética dipolar entre o momento magnético eletrónico do átomo paramagnético e os momentos magnéticos dos prótons das moléculas de água na vizinhança, pelo que os movimentos moleculares levam a flutuações aleatórias nesta interação magnética dipolar, levando a uma redução tanto do tempo de relaxação T1 como do T2 dos prótons de água. O Gadolínio (Gd^{3+}) e o Manganésio (Mn^{2+}) são exemplos de AC's paramagnéticos, possuindo o Gd^{3+} sete eletrões desemparelhados, enquanto que o Mn^{2+} possui cinco eletrões desemparelhados.

Os íons livres de Gd^{3+} são altamente tóxicos devido à sua tendência para precipitar e serem depositados no fígado, gânglios linfáticos e ossos, que prolongam o seu tempo de permanência no organismo. Podem também obstruir a passagem de íons de cálcio pelas células musculares, e bloquear o fluxo de cálcio na epífise dos ossos e células do tecido nervoso, impedindo a transmissão neuromuscular. Um fator importante que contribui para esta toxicidade é o facto de o Gd substituir alguns metais endógenos, como o zinco [12].

Devido ao facto de na sua forma iónica os metais paramagnéticos não conduzirem a uma biodistribuição desejável, e ao facto de apresentarem uma toxicidade relativamente alta, é necessário ligar os metais a um 'ligante', surgindo um complexo denominado quelato, que conduz a uma biodistribuição mais desejável e mais segura [11, 13]. Os compostos extracelulares quelatos de Gadolínio são a classe de AC's mais utilizada na prática clínica. Após a sua administração, estes compostos distribuem-se rapidamente no espaço vascular e pelo compartimento extracelular, sendo rapidamente excretados pelos rins. São compostos bem tolerados, e com baixos níveis de toxicidade, sendo os seus efeitos laterais ligeiros e transitórios, ocorrendo com uma incidência menor do que 2%, e sendo os mais comuns a náusea, enxaqueca e vômitos. No entanto, ainda que raramente, são descritas reações de anafilaxia graves envolvendo manifestações respiratórias, cardiovasculares, cutâneas e gastrointestinais, ocorrendo a sua maioria em pacientes com um historial ao nível das dificuldades respiratórias [12, 14].

Estes AC's realçam o efeito de T1, ou seja, tornam os tecidos hiperintensos quando ponderados em T1, pelo que o efeito predominante a baixas doses destes tipos de AC's é o de diminuir T1.

Menos de 0,5% dos tecidos biológicos são naturalmente paramagnéticos, pelo que os agentes paramagnéticos podem ser utilizados para aumentar a relaxação, e permitir uma melhoria no contraste em IRM, sendo que é a presença destes que influencia a aparência na imagem, e não o próprio agente que é visível na imagem por IRM [3].

2.2.1.2 Agentes de Contraste Superparamagnéticos

As partículas ferromagnéticas de tamanho inferior a 10 nm apresentam superparamagnetismo, caracterizando-se pelo facto de o seu momento magnético ser livre de poder oscilar por estímulo térmico, enquanto que os seus momentos atómicos individuais mantêm o seu estado ordenado, conduzindo a curvas de Magnetização, M , em função do campo magnético aplicado, H , (sendo H o campo magnético dentro da matéria) com histerese [15].

Um AC superparamagnético é em geral constituído por colóides da óxide de ferro, cujo tamanho varia tipicamente entre os 5-200 nm, compostos por pequenos cristais (1-10 nm) que possuem milhares de momentos magnéticos [16].

O comportamento dos materiais superparamagnéticos é semelhante ao paramagnetismo. No entanto, o momento magnético de todo o cristalito tende a alinhar-se com o

campo magnético, ao invés de cada átomo ser individualmente influenciado pelo campo magnético externo. Assim sendo, os iões individuais encontram-se mutuamente alinhados, e os cristais têm um momento magnético permanente que aumenta na presença de um campo magnético externo.

Cada partícula Superparamagnética (SPM) é constituída por um núcleo com um ou mais cristais magnéticos incorporados num revestimento, cujo objetivo é prevenir a aglomeração, aliando também noutros casos a possibilidade de “direcionar” a partícula SPM para um alvo específico [17].

Os óxidos de ferro superparamagnéticos podem ser classificados, de acordo com o tamanho total do seu cristal, em três tipos [17, 18]:

- USPIO (*ultra-small paramagnetic iron oxide particles*) - que se caracterizam por possuírem apenas um cristal superparamagnético, com diâmetro inferior a 40 nm;
- SPIO (*small particles of iron oxide*) - em que vários núcleos superparamagnéticos se encontram distribuídos na mesma partícula, cujo tamanho hidrodinâmico é superior a 40 nm;
- MPIO (*mícron-sized particles of iron oxide*) - que são partículas maiores em comparação com as anteriormente mencionadas, possuindo um diâmetro da ordem de alguns microns.

AC's superparamagnéticos produzem gradientes de campo magnético local que quebram a homogeneidade do campo magnético local, pelo que o tempo de relaxação T2 é reduzido por efeito da difusão da água através destes gradientes de campo. Estes AC's são utilizados em imagens ponderadas por T2 [10].

Após a administração intravenosa de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro há uma absorção específica destas pelo sistema reticuloendotelial (ou mononuclear fagocitário), a maioria no fígado (aproximadamente 80% da dose injetada é absorvida pelas células de Kupffer) e baço (entre 5 a 10% da dose injetada) [12]. Estas são fortes potenciadores da relaxação de prótons, com grandes efeitos de diminuição de T2, e podem ser utilizadas em mais baixas concentrações do que os agentes paramagnéticos [19].

2.2.2 Efeito na Imagem

A eficiência de um agente de contraste é estudada em soluções aquosas, e é quantificada pela relaxividade, que pode ser longitudinal ($r1$) ou transversal ($r2$), e corresponde a uma medida de quanto aumenta, por unidade de concentração de um agente de contraste, o ritmo de relaxação dos prótons [20].

A taxa de relaxação longitudinal ($R1$), que corresponde ao inverso do tempo de relaxação T1, segue a seguinte expressão:

$$R1 = r1[AC] + R1_0 \quad (2.9)$$

em que $[AC]$ corresponde à concentração do agente de contraste em $mmol/litro(mM)$, $r1$ é a relaxividade longitudinal em $mM^{-1}s^{-1}$, e $R1_0$ corresponde à taxa de relaxação para uma concentração nula de agente de contraste. A taxa de relaxação transversal ($R2$) é definida de forma análoga à anterior:

$$R2 = r2[AC] + R2_0 \quad (2.10)$$

sendo que neste caso $r2$ corresponde à relaxividade transversal [18, 11].

As expressões anteriores apenas podem ser aplicadas quando a relaxação dos prótons se deve a interações dipolares, ou seja, uma interação próxima entre cada partícula magnética individual e as moléculas de água no meio, pelo que o agente de contraste deve-se apresentar uniformemente distribuído no meio em que se encontra [20].

Um AC pode assim ser classificado como Positivo ou Negativo. A sua classificação como positivos provém do facto de possibilitarem tornar a imagem mais clara, afetando predominantemente T1. Por outro lado, a classificação como negativos deve-se ao facto de escurecerem a imagem a região de interesse, tendo um efeito maioritário sobre o tempo de relaxação T2, o que se verifica no caso dos agentes de contraste superparamagnéticos, que são maioritariamente utilizados como agentes de contraste negativos [18]. Qualquer AC que diminui T1, diminui também T2, no entanto a condição contrária não é necessariamente verdadeira, pois um agente que diminui T2 não tem obrigatoriamente que diminuir T1 [11].

No caso do óxido de ferro, a campos magnéticos altos, que são os que interessam para aplicações a nível de IRM, a relaxividade transversal ($r2$) é muito maior do que a relaxividade longitudinal ($r1$) [17].

Diversas partículas têm vindo a ser desenvolvidas e estudadas, com o intuito de analisar a sua eficiência como agentes de contraste. Na tabela 2.1 constam alguns destes estudos retratados na literatura.

Tabela 2.1: Valores das relaxividades para nanopartículas, referidos em estudos publicados, expressos em $mM^{-1}s^{-1}$

Nome[referência]	Composição	r1	r2	B(T)
MFL [21]	Nanocristais de Magmite encapsulados em vesículas unilamelares de Fosfatidicolina de Ovo (EPC)	10	67	0.47
MFL-PEG [21]	Nanocristais de Magmite encapsulados em vesículas unilamelares de Fosfatidicolina de Ovo (EPC), e com ligação a DSPE-PEG	18.6	116	20.47
Mion-46 L [18]	USPIO, constituídos por cristais de magnetite ou magmite	3.95	19.6	1.5
Magmite [22]	Magmite em solução aquosa	20.81	28.61	0.5
Magmite [22]	Magmite em solução aquosa	17.59	35.75	1.5
AMNP [23]	Nanocristais de Magnetite negativamente carregados	12	363	1.5
AMNP [23]	Nanocristais de Magnetite negativamente carregados	6.1	261	4.7
AMNP [23]	Nanocristais de Magnetite negativamente carregados	2.9	191	7
Rh-AMNP [24]	AMNP Revestidos com ácido meso 2,3-ácido dimercaptosuccínico e rotulados com dimetil-rodamina	4.78	379	7
Rh-AMNP [24]	AMNP Revestidos com ácido meso 2,3-ácido dimercaptosuccínico e rotulados com dimetil-rodamina	3.28	386	11.7
Rh-AMNP [24]	AMNP Revestidos com ácido meso 2,3-ácido dimercaptosuccínico e rotulados com dimetil-rodamina	2	356	17.6
Stealth-ML [25]	Fe_3O_4 encapsulado em DMPC (dimiristoil fosfatidicolina)	3	240	1.5

2.2.3 Biodistribuição

2.2.3.1 Agentes de Contraste de Fluidos Extracelulares (ECF)

Após a sua administração por meio intravenoso, estes tipos de AC's escapam rapidamente do sangue para o interstício extracelular, com um tempo de distribuição de aproximadamente 5 min, sendo eliminados maioritariamente pelos rins com tempo de eliminação de aproximadamente 80 min.

Em áreas com barreira hematoencefálica (barreira entre os vasos sanguíneos no sistema nervoso central e o próprio sistema nervoso central) intacta, o vazamento extracelular deste tipo de AC's não ocorre, e como muitas patologias no cérebro estão associadas com a alteração da permeabilidade dos capilares, há acumulação de AC's nestas regiões, permitindo uma melhoria na sua visualização em imagens de IRM ponderadas em T1. Outra aplicação destes AC's é em imagens do corpo, permitindo a visualização de lesões, tais como tumores, por exemplo na coluna ou no fígado.

Estes agentes são normalmente compostos quelatos de Gd^{3+} [16, 11].

2.2.3.2 Agentes de Contraste Intravasculares

Estes AC's diferem dos descritos anteriormente, ECF, pelo seu tamanho, sendo significativamente maiores e pelo facto de possuírem maiores valores de relaxividade longitudinal, r_1 . Devido ao seu alto peso molecular ($>20kDa$) estes não escapam para o interstício extracelular, permanecendo no sistema intravascular por um tempo mais prolongado do que o dos agentes ECF.

São normalmente utilizados em angiografia de alta qualidade devido ao facto de diminuírem o valor de T_1 do sangue. O seu tempo de duração intravascular e o alto valor de r_1 permitem a obtenção de imagens, dos vasos sanguíneos, com alto valor de razão sinal-ruído. No entanto, é importante assegurar simultaneamente que a relaxividade r_2 é baixa o suficiente por forma a evitar a perda excessiva de sinal por T_2 e T_2^* [16, 11].

2.2.3.3 Agentes de Contraste Específicos para órgãos ou tecidos

Estes AC's caracterizam-se por serem recolhidos por um tipo de células particulares (como o exemplo de células de Kupffer e hepatócitos), pelo que, só melhoram o contraste em órgãos em que estas células se encontrem presentes, neste caso no fígado.

SPIO's e USPIO's acumulam-se no sistema reticuloendotelial do fígado, pelo que podem ser classificados como AC's específicos para o fígado, mesmo possuindo em alguns casos um tempo de circulação grande antecedente à sua acumulação no órgão.

Outro tipo destes AC's são os orais, que são distribuídos no trato gastro intestinal por forma a melhorar a imagem dos intestinos em exames obtidos após utilização destes AC's [16].

2.2.4 Magnetolipossomas

O termo magnetolipossomas (ML's) refere-se a nanopartículas magnéticas encapsuladas em vesículas lipídicas. Foram inicialmente criados com o intuito de estudar processos em membranas, no entanto, foram sendo descobertas novas aplicações em diversas áreas biotecnológicas e biomédicas, incluindo em IRM. Devido ao revestimento lipídico estes podem ser facilmente funcionalizados, adicionando-lhes por exemplo PEG (polietileno glicol), podendo ser úteis como fármacos no diagnóstico ou tratamento de doenças. Podem ainda ser desenvolvidos de forma a serem utilizados como AC's em IRM [25, 26]. Caracterizam-se por serem biologicamente estáveis [27]. A composição química do núcleo destas partículas (o que lhes confere propriedades magnéticas) é importante na determinação da sua biocompatibilidade. O composto mais utilizado na constituição do núcleo é a magnetite (Fe_3O_4), no entanto esta é facilmente oxidada em magmiste, Fe_2O_3 , sendo que nesta forma, a possibilidade de desencadear processos oxidativos no organismo é menor [28].

Os ML's dividem-se em dois grupos: os "Grandes ML's" e os "Pequenos ML's". As "Grandes vesículas Unilamelares" ou "Grandes ML's", normalmente preparados por extrusão ou preparação de solvente orgânico, que incorporam no interior da cavidade aquosa do lipossoma, múltiplos USPIO's ou SPIO's solúveis em água, podendo-se controlar a sua quantidade. Os pequenos núcleos de óxido de ferro (14 nm diâmetro), onde uma bicamada lipídica é imediatamente ligada à superfície dos núcleos de óxido de ferro, designam-se por "Pequenos ML's". Estes últimos, devido à sua grande estabilidade e à forte ligação da bicamada lipídica com o núcleo de óxido de ferro, que protege eficazmente este núcleo da sua degradação, apresentam grande resistência à degradação dependente do pH. Os "Grandes ML's" podem ser facilmente degradados, deixando a sua camada interna exposta, fazendo com que os magnetolipossomas passem a possuir uma superfície hidrofóbica, resultando numa agregação de ML's, e consequente alteração favorável da relaxação transversal devido ao agrupamento de núcleos de óxido de ferro [29].

2.2.4.1 Lipossomas

Os lipossomas são formados quando os fosfolípidos, em ambiente aquoso, formam espontaneamente estruturas vesiculares esféricas de uma - unilamelar - ou múltiplas bicamadas - multilamelar. As vesículas unilamelares podem ser classificadas quanto ao seu tamanho, em SUV (*small unilamellar vesicles*) ou LUV (*Large unilamellar vesicles*) [30]. Os lipossomas são constituídos por compostos anfifílicos, caracterizando-se por possuir na sua estrutura uma região polar que interage com a água, e uma região apolar, que se orienta para o interior da estrutura, de forma a evitar o contacto com o meio aquoso, podendo encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, ficando as primeiras no compartimento aquoso, e as lipofílicas inseridas na membrana. Os lípidos mais utilizados na formulação de lipossomas são aqueles que apresentam forma cilíndrica, tais como fosfatidicolinas, fosfatidilglicerol ou fosfatidiserina, sendo as primeiras as mais utilizadas, pois apresentam grande estabilidade face a variações de pH ou a concentrações de sal no meio. A fosfatidicolina de soja é um exemplo destes lípidos [31]. A sua estrutura molecular encontra-se apresentada na figura 2.5 [32].

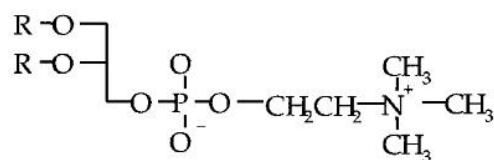


Figura 2.5: Estrutura Molecular da Fosfatidicolina de Soja, em que R representa uma cadeia longa de ácidos gordos

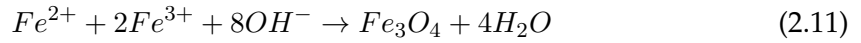
Um conceito importante é a temperatura de transição de fase, em que a membrana passa de uma fase em que a cadeia hidrocarbonada do lípido está em estado ordenado, para uma fase em que as moléculas ficam com movimentos mais livres e os

radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. Esta temperatura é função do comprimento e saturação da cadeia lipídica. A permeabilidade dos lipossomas, ou seja, o fluxo de soluto que sai do compartimento aquoso pela bicamada, é mais baixa quando a temperatura é menor do que a temperatura de transição [31, 32]. A permeabilidade da membrana depende da sua fluidez e da natureza do soluto. A estabilidade da membrana depende do grau de insaturação, sendo que quanto mais insaturado for, mais rapidamente pode ser oxidado e portanto menos estável é.

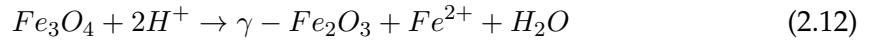
A adição de colesterol, intercalada com os fosfolípidos, diminui a permeabilidade da membrana, fazendo com que esta fique mais rígida, levando a uma diminuição da flexibilidade da cadeia lipídica.

2.2.4.2 Nanopartículas de Magnetite

A magnetite (Fe_3O_4) pertence à família dos óxidos de ferro. As ferrites cúbicas apresentam a fórmula geral MFe_2O_4 , em que M representa um átomo metálico divalente (Mg, Fe, Ni, ou Zn). A magnetite ($Fe^{2+}(Fe_2^{3+}O_4^{2-})$) é um destes exemplos [33]. Os óxidos de ferro são normalmente preparados por estequiometria de envelhecimento de sais ferrosos em meio aquoso, sendo que a equação química que descreve a reação de formação da magnetite é a seguinte:



No entanto, a magnetite não é muito estável e é sensível à oxidação, pelo que é transformada em magmíte ($\gamma - Fe_2O_3$) na presença de oxigénio [13]:



Assim sendo, pode tornar-se difícil encontrar na área das aplicações biomédicas uma amostra pura de magnetite.

A magnetite tem a particularidade de conter tanto iões de Fe^{2+} como de Fe^{3+} , numa estrutura de espinela inversa. A estrutura de cada célula unitária caracteriza-se por 32 aniões de oxigénio que formam uma face cúbica centrada, com um comprimento de cada aresta de cerca de 0,839 nm, sendo que os iões de ferro se encontram localizados em 8 posições tetraédricas, cercados por 4 iões de oxigénio, e em 16 posições octaédricas, cercados por 8 iões de oxigénio. As posições tetraédricas são exclusivamente ocupadas por iões de Fe^{3+} , enquanto que os iões de Fe^{2+} e Fe^{3+} ocupam alternadamente as posições octaédricas [18], tal como representado na figura 2.6 [9].

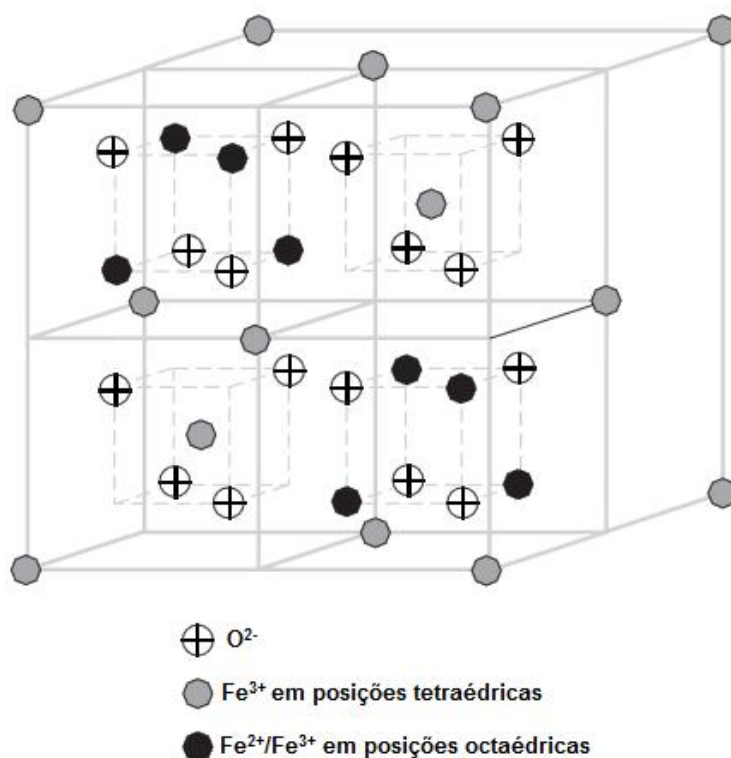


Figura 2.6: Estrutura da magnetite

Todos os momentos magnéticos dos íons de ferro tetraédricos encontram-se alinhados numa direção específica, enquanto que no caso dos íons de ferro octaédricos, os momentos magnéticos encontram-se alinhados segundo a direção oposta. O momento magnético resultante de um cristal de magnetite não é dirigido arbitrariamente, encontrando-se preferencialmente alinhado segundo direções específicas, denominadas de eixos de anisotropia. No caso da magnetite, devido à sua simetria cúbica, tem oito eixos de anisotropia, ao longo das diagonais de cada célula unitária cúbica [18].

As nanopartículas de magnetite diminuem T2 e T2* das regiões vizinhas, produzindo uma diminuição na intensidade do sinal em imagens ponderadas em T2 e T2* em IRM [3, 18].

A relaxividade das nanopartículas de magnetite depende muito do campo magnético aplicado, sendo que quando o campo magnético é suficientemente grande, a relaxividade longitudinal tende para zero [18]. Estas nanopartículas são geralmente utilizadas como agente de contraste em imagem por ressonância magnética em exames ao fígado, sendo recolhidas pela atividade fagocítica das células de Kupffer e a perda de coerência dos prótons vizinhos conduz a uma diminuição dos tempos de relaxação T2 [34].

Na prática, após a sua administração no organismo, as nanopartículas de óxido de ferro são captadas por fagocitose pelo sistema reticuloendotelial, reduzindo intensamente o sinal em imagens ponderadas em T2 do parênquima normal do fígado e do baço, podendo realçar lesões que não captam contraste, sendo uma das suas aplicação na deteção de metástases hepáticas [14].



Procedimento Experimental

Este capítulo aborda numa primeira parte os materiais e métodos utilizados na síntese e estudo do potencial como AC, ou seja, o estudo da sua relaxividade, de 3 diferentes amostras de magnetolipossomas. Estes ML's serão denominados por "ML's SPC:Chol" ao longo da presente dissertação. Na segunda parte apresenta-se o efeito na imagem por RM de novos magnetolipossomas de longo período de circulação, denominados por "ML's C" ao longo da presente dissertação.

3.1 Materiais e Métodos para o estudo da relaxividade de ML's SPC:Chol

Três ML's diferentes foram utilizados nesta primeira parte. Estes são constituídos por um núcleo magnético de magnetite encapsulado em SPC (fosfatidicolina de soja), diferenciando as três amostras entre si pela quantidade de colesterol (Chol) presente na bicamada fosfolipídica, ou seja pela razão molar SPC:Chol.

3.1.1 Síntese do Ferrofluido

A síntese do ferrofluido foi composta por duas partes, sendo que na primeira foram produzidas as partículas de magnetite, e na segunda foi adicionado a estas um surfactante, cujo objetivo foi o de prevenir a sua aglomeração. Este procedimento realizou-se no Instituto Superior Técnico (IST), sob a supervisão da Dra. Maria Clara Gonçalves e com a colaboração do Dr. Luís Fortes. O Protocolo seguido baseou-se na Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica, de Marta da Rocha Faria, do IST [33].

Preparou-se uma solução 2M de ácido clorídrico, adicionando-se 4,14mL de HCl

(37%) a 20, 86mL de água destilada. Em seguida prepararam-se duas soluções, dissolvendo-se 0, 3975g de Cloreto Férrico (II) Tetrahidratado ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) em 1mL da solução de HCl preparada anteriormente (solução A), e para a segunda, dissolveu-se 0, 2702g de Cloreto Férrico (III) hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) em 4mL da solução de HCl (solução B), por forma a obter soluções de 2M. As duas soluções apresentaram cor amarela. Em seguida, misturaram-se as duas soluções (A+B), e colocaram-se sob agitação vigorosa, verificando-se uma mudança de cor para vermelho (solução C). Preparou-se uma solução aquosa de amónia (NH_4OH) 0, 7M, diluindo-se 4, 8mL de solução de amónia(25%), em 100mL de água bidestilada. Em seguida adicionou-se 50mL da solução aquosa de amónia à solução C, ainda sob agitação vigorosa, adicionando-se cerca de 1mL a cada 10 segundos, e obtendo-se um precipitado preto, correspondente à Magnetite.

O excesso da solução aquosa de amónia (sobrenadante) foi removido, com uma pipeta de Pasteur, através do auxílio de um íman. Em seguida adicionou-se água bidestilada, com o intuito de retirar o excesso de reagente (amónia) e removeu-se a mesma, tal como se havia procedido para remover a solução aquosa de amónia. O passo seguinte consistiu na adição do surfactante à magnetite, adicionando-se a esta 8mL de Hidróxido de Tetrametilamónio, $(CH_3)_4NOH$, (solução aquosa a 25%), e colocando esta solução sob vigorosa agitação mecânica, até se verificar que todo o sólido estava suspenso no líquido. Mais uma vez, com a ajuda de um íman, retirou-se o excesso de sobrenadante da solução, obtendo-se o ferrofluido.



Figura 3.1: Ferrofluido obtido

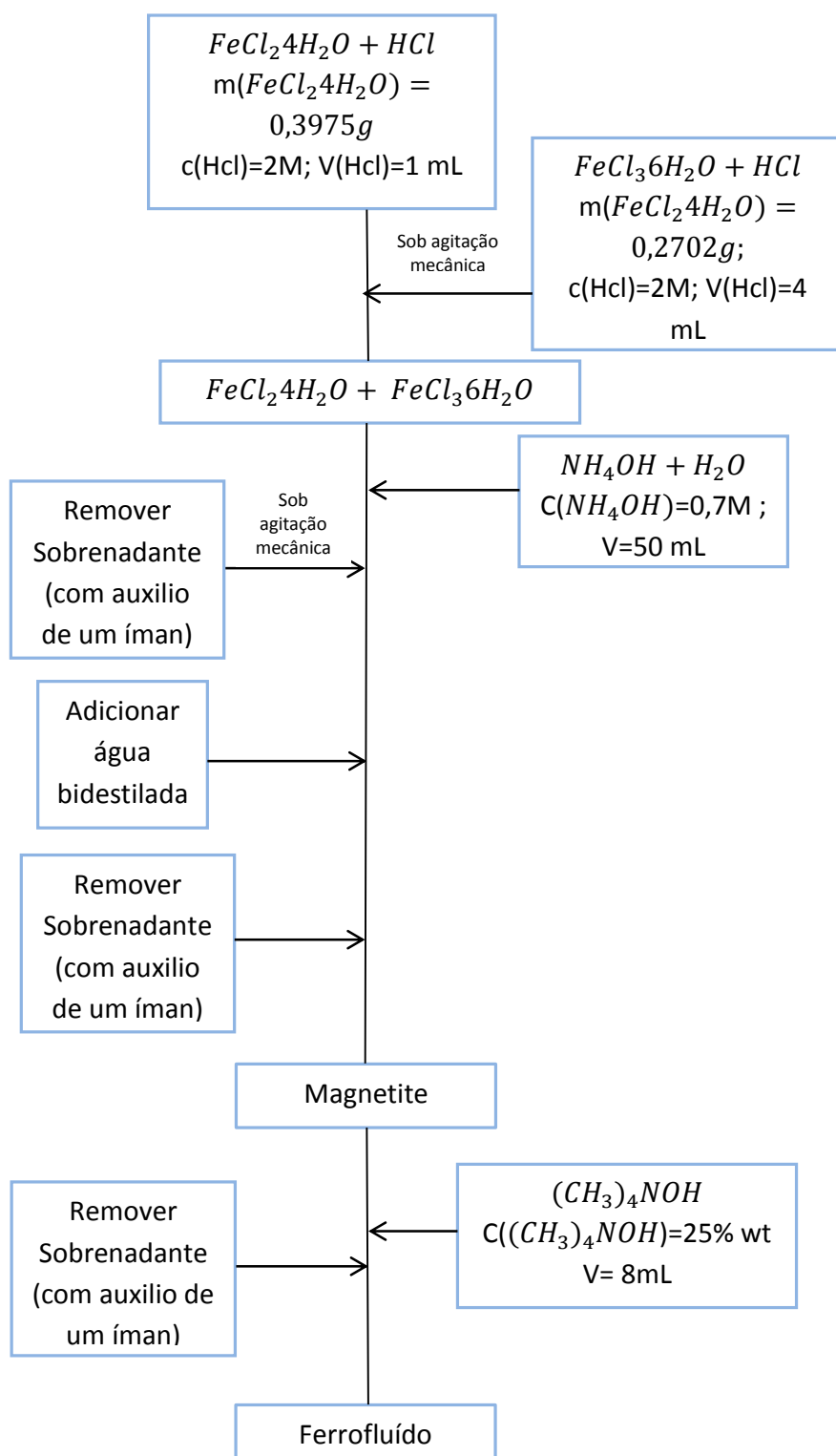


Figura 3.2: Diagrama representativo do procedimento experimental para a síntese do ferrofluido

3.1.2 Síntese dos ML's SPC:Chol

Os magnetolipossomas preparados são constituídos por núcleos de magnetite da ordem dos 10nm , envoltos por um surfactante e encapsulados por Fosfatidicolina de Soja (SPC), sendo que esta possui na sua membrana, para as diferentes amostras sintetizadas, diferentes quantidades de colesterol. Este procedimento experimental realizou-se na Unidade de “Novas Formas de Agentes Bioativos”, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, sob a supervisão da Dra. Maria Bárbara Martins e com a colaboração da aluna de Mestrado Filipa Fontes.

Prepararam-se magnetolipossomas com formulações distintas, diferindo entre si na quantidade de colesterol (Chol). Na tabela 3.1 encontram-se apresentadas as razões molares SPC:Chol para as três formulações.

Tabela 3.1: Razão molar SPC:Colesterol das amostras

Nome da Amostra	Razão molar SPC:Chol
SPC:Chol 1:0	1:0
SPC:Chol 1:0.5	1:0.5
SPC:Chol 1:1	1:1

Para a preparação do filme de lípidos misturou-se SPC com o colesterol, nas quantidades apresentadas na tabela 3.2:

Tabela 3.2: Quantidades de SPC e Colesterol em gramas

Nome da Amostra	SPC(g)	Colesterol(g)
SPC:Chol 1:0	0.075	0
SPC:Chol 1:0.5	0.0511	0.0126
SPC:Chol 1:1	0.0379	0.0194

De seguida dissolveu-se cada uma das amostras em 4mL de solvente orgânico, neste caso clorofórmio, secando-se em seguida no rotavapor (a vácuo) a 40°C , retirando-se o clorofórmio, ficando o filme de lípidos no fundo. Foi importante garantir que ao filme de lípidos foi retirado todo o solvente orgânico, ficando este completamente seco.

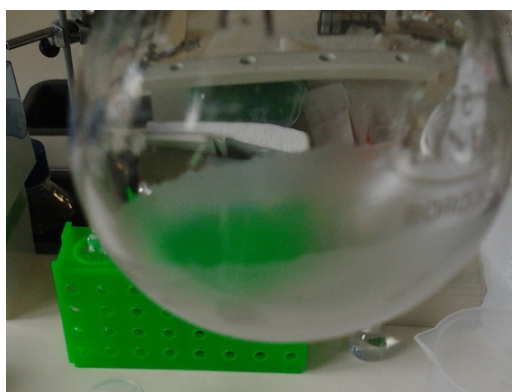


Figura 3.3: Filme de lípidos obtido

O passo seguinte foi a dissolução do ferrofluido preparado anteriormente, em água, conforme os valores indicados na tabela 3.3, seguido de um banho de ultra-sons.

Tabela 3.3: Quantidades de Fe_3O_4 em g e água em mL

Nome da Amostra	Fe_3O_4 (g)	Água(mL)
SPC:Chol 1:0	0.075	5
SPC:Chol 1:0.5	0.025	5
SPC:Chol 1:1	0.0025	5

Este ferrofluido utilizou-se como meio de hidratação, adicionando-se ao filme de lípidos e deixando-se repousar por 24 h, com o intuito de as nanopartículas de óxido de ferro se incorporarem espontaneamente no interior dos lipossomas. Após as 24 h, as partículas maiores que não ficaram incorporadas nos lipossomas, encontravam-se depositadas no fundo da mistura, sendo excluídas da mesma. Em seguida a mistura foi submetida a um banho de ultra-sons durante 10 min.

Para a redução do tamanho dos magnetolipossomas foi aplicada a técnica de extrusão, fazendo-se passar a mistura através de membranas de policarbonato com diferentes porosidades, pelo que se fez passar a preparação 2 vezes por membranas de 800nm, 600nm e 400nm, por esta ordem, e finalmente 4 vezes por uma membrana de 200nm, sendo esta substituída por uma nova ao fim da 2ª utilização.



Figura 3.4: Extrusor

Após a extrusão foi medido o tamanho médio dos magnetolipossomas por DLS (*Dynamic Light Scattering*). O volume de amostra após a extrusão foi de 4mL.

Finalmente, com o intuito de separar o óxido de ferro não incorporado da restante mistura, recorreu-se à Cromatografia de Exclusão Molecular, que permite separar moléculas com diferentes tamanhos, ou seja, moléculas grandes não penetram no interior da resina (partículas porosas de gel) movendo-se mais rapidamente ao longo da coluna de gel de onde emergem primeiro, enquanto que as moléculas mais pequenas no gel, emergem da coluna mais tarde. Assim o objetivo foi o de que as partículas de óxido de ferro não incorporadas ficassem na resina, enquanto os lipossomas já tinham sido retirados, separando-se assim ambos. Lavou-se cada coluna com 20mL de água, e recolheu-se a

amostra que emergiu da coluna. Em seguida aplicou-se 1mL de amostra, e recolheu-se, adicionando-se de seguida 10mL de água, recolhendo-se para 8 tubos diferentes cada mL emergente da coluna.

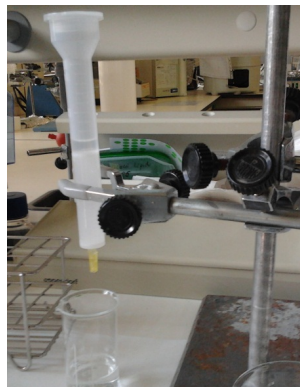


Figura 3.5: Coluna de Cromatografia

O processo foi repetido mais 3 vezes, lavando-se a coluna com 20mL de água entre cada repetição, ficando o processo completo para os 4mL de volume de amostra obtido anteriormente. Os tubos que apresentaram turbidez (o 3, 4 e 5) ou seja, os que continham os magnetolipossomas, em cada mL de amostra, foram em seguida misturados, obtendo-se um volume final de amostra de 12mL após purificação. A existência dos magnetolipossomas nestes tubos foi comprovada por absorção UV, apresentando os tubos 3, 4 e 5 uma absorção muito maior que os restantes. A figura 3.6 pretende demonstrar a estrutura dos magnetolipossomas desenvolvidos (adaptado de [32]).

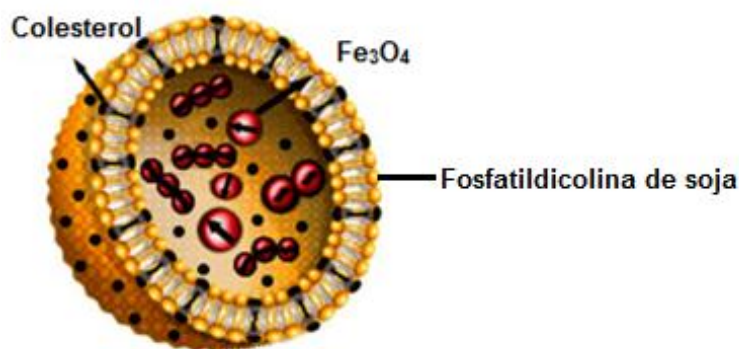


Figura 3.6: Esquema representativo dos ML's SPC:Chol

Relativamente às amostras SPC:Chol 1:0 e SPC:Chol 1:0,5, foi também preparada uma amostra "branca", ou seja, apenas se seguiu o protocolo para a formulação dos lipossomas, sem a incorporação do ferrofluido no seu interior.

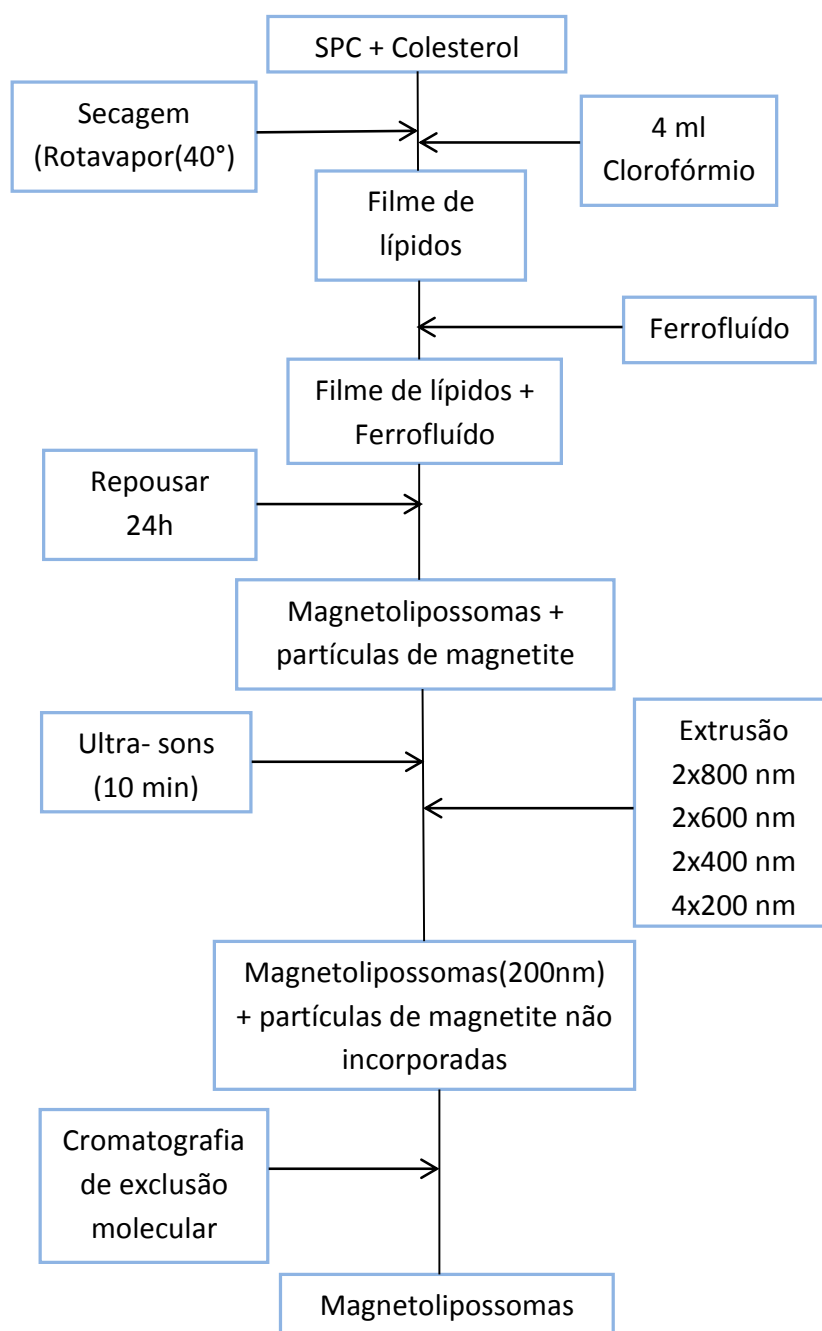


Figura 3.7: Diagrama representativo do procedimento experimental para a síntese dos ML's SPC:Chol

3.1.3 Preparação de soluções para estudo da relaxividade dos ML's SPC:Chol

Com vista a realizar o estudo da relaxividade dos magnetolipossomas, ou seja, o estudo da sua eficiência como agente de contraste em IRM, foi necessária a obtenção dos tempos de relaxação longitudinal e transversal, em segundos, em função de diferentes concentrações de ferro total do agente de contraste em estudo, expressas em *milimol/litro*(*mM*).

O teor de ferro total foi obtido através de análises realizadas no Laboratório de Análises do IST pelo Método ICP (*Inductively Coupled Plasma*) SMEWW 3210.

Partindo das 3 amostras ML SPC:Chol preparadas, e já sabendo qual a concentração de Ferro Total em cada uma, foram realizadas diluições em água destilada, com vista a cumprir o objetivo proposto, exceto nas amostras ditas "Brancas", em que a concentração de Ferro é nula.

As diluições em água destilada foram realizadas, através da pesagem de uma parte de cada uma das amostras, e adicionando, o seu peso em água destilada, conforme a diluição pretendida.

Após cada diluição ter sido efetuada, todas as amostras foram colocadas em tubos de RMN, com diâmetro de 5 mm.

3.1.4 Protocolo para medição de T1 e T2 por Espectroscopia de RMN

O equipamento utilizado para estudar a relaxividade das amostras com diferentes formulações de magnetolipossomas referidas anteriormente, foi um *Espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHz Avance III*, existente no CENIMAT/i3N (figura 3.8).



Figura 3.8: Sistema do magneto à esquerda, e consola do operador e do hardware electrónico à direita

Para realizar cada uma das medições dos tempos de relaxação procedeu-se da seguinte forma: inicialmente agitou-se cada uma das amostras (garantindo-se que a relaxação dos prótons se deve a interações dipolares, encontrando-se os magnetolipossomas uniformemente distribuídos no meio em que se encontram) e em seguida colocou-se cada tubo de RMN na bobina de radiofrequência e de deteção, garantindo que a amostra se

encontrava centrada face à bobina, e em seguida, colocou-se no espectrómetro. Foram utilizados tubos standard RMN de 5 mm e a sonda utilizada foi uma Sonda de Alta Resolução de Líquidos de 5 mm.

Procedeu-se à determinação exata da duração dos pulsos $\frac{\pi}{2}$ e π para uma potência de 15 Watt, obtendo-se os valores de $15\mu s$ e $31.5\mu s$ respetivamente. Estes foram os valores utilizados para a determinação de todos os tempos de relaxação. Todas as medidas foram efectuadas a $25^\circ C$.

Tanto em imagem como em espectroscopia de RMN é necessária a aplicação de pulsos de radiofrequência sobre a amostra em estudo com o intuito de se poderem obter sinais coerentes, coletados por uma bobina de excitação/receção. Estes pulsos são aplicados em sequências específicas, que vão permitir a produção de sinais de RM, que irão fornecer a informação pretendida acerca da amostra em estudo.

A sequência de pulsos utilizada para o tempo de relaxação T1 foi a sequência Inversão-Recuperação, em que se aplica inicialmente um pulso de π , e em seguida, após um tempo TI (tempo de inversão), um pulso de $\pi/2$ é aplicado sobre o mesmo eixo. A um tempo T após a aplicação do pulso de $\pi/2$, um pulso de π é aplicado, para recuperar a coerência de fase, após o tempo $TE = 2T$ depois do pulso de $\pi/2$, surgindo um eco [35].

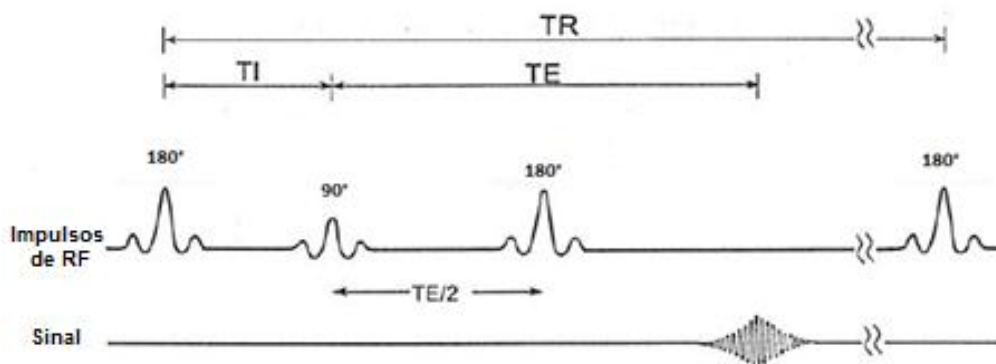


Figura 3.9: Diagrama ilustrativo da sequência de Inversão Recuperação

Os parâmetros utilizados nesta sequência, e que permitiram a determinação de T1, foram os mesmos para todas as amostras em estudo:

- $TD = 8192$
- $DW = 100\mu s$
- $DE = 100\mu s$
- $D1 = 15s$
- $NS = 1$

Relativamente à determinação do tempo de relaxação T_2 , a sequência de pulsos utilizada foi a CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*). Na sequência CPMG, um pulso inicial de excitação de $\pi/2$ no tempo $t = 0$, sobre um determinado eixo ($+x$), deve ser aplicado, com frequência igual à frequência de Larmor, e assim este pulso leva a magnetização M_0 para o eixo y . Em seguida é aplicado um pulso π em $t = \tau$, novamente sobre o mesmo eixo ($+x$), havendo a formação de um eco em $t = 2\tau$ com magnetização sobre o eixo $+y$. Aplicando-se novamente um pulso de π sobre o mesmo eixo, em $t = 3\tau$, um novo eco surge em $t = 4\tau$, mais uma vez sobre o eixo $+y$. Assim, se sucessivos pulsos de π forem aplicados em $t = (2n + 1)\tau$, com $n = 0, 1, 2, 3, \dots$ há a formação de ecos em $t = (2n + 2)\tau$ sobre o eixo $+y$, podendo-se coletar o sinal. A magnetização transversal ($+y$) decai exponencialmente com a constante de tempo T_2 [36, 37]. Assim, Meiboom e Gill propuseram que fossem utilizadas diferentes fases para os pulsos de excitação, propondo que o pulso de $\pi/2$ e subsequentes pulsos de π estivessem em quadratura [38].

Os parâmetros utilizados foram os seguintes para todas as amostras ML's SPC:Chol:

- $TD = 32768$
- $DW = 40\mu s$
- $DE = 100\mu s$
- $D1 = 15s$
- $D20 = 50ms$
- $NS = 8$

Obtido o espectro para cada amostra, determinou-se a sua transformada de Fourier, e em seguida foi possível realizar o processamento e determinar os valores das constantes de relaxação.

3.2 Materiais e Métodos para o estudo do comportamento de ML's C, por IRM, em órgãos

3.2.1 Preparação do órgão em estudo

Os ML's utilizados neste ponto da parte experimental foram desenvolvidos na Unidade de "Novas Formas de Agentes Bioativos", da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, sob a coordenação da Dra. Maria Luísa Corvo. O núcleo magnético é constituído por nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4), com um diâmetro médio de $10nm$, da SIGMA-ALDRICH, revestidas com polietileno glicol (PEG), e encapsuladas por fosfatidilcolina de ovo, possuindo esta na sua bicamada, ligações a polímeros de PEG. Estes caracterizam-se por serem ML's com um longo período de circulação na corrente sanguínea. O diâmetro médio final das nanopartículas foi de $150nm$.

Para o presente estudo foram utilizados ratos de laboratório, sujeitos a diferentes condições, consoante o caso em estudo:

- **Caso A:** Animal sujeito a isquemia hepática (suspensão da circulação local sanguínea) por 30 minutos, deixando-se recuperar por 24 horas, e ao fim deste tempo, foi sacrificado;
- **Caso B, C e D:** Animais sujeitos a isquemia hepática por 30 minutos, deixando-se recuperar por 24 horas. Foram administrados por meio intravenoso os ML's C, e ao fim de 24 horas foram sacrificados;
- **Caso E:** Animal não sujeito a isquemia hepática, com administração por meio intravenoso de ML's C, e sacrificado.

Em todos os casos, foi retirado o fígado, lavado exteriormente e fixado em formol, por forma a garantir a sua conservação.

3.2.2 Protocolo para obtenção de imagens, por IRM, em órgãos

Utilizou-se o *Espectrómetro Bruker 300 MHz Advance III* com a capacidade para micro-imagem.

O órgão em estudo foi o fígado, que nestes animais é constituído por quatro lobos [39] (apresentados na figura 3.10). Foi escolhido o lobo médio direito.

- **Lobo Médio (ML)**, que ocupa aproximadamente 38% do peso total, e é dividido pela fissura média (FL), dividindo-o em RML (porção do lado direito) e LML (porção do lado esquerdo);
- **Lobo Direito (RL)**, que ocupa cerca de 22% do peso total, e que se encontra dividido por uma fissura horizontal, constituindo o SRL (lobo posterior direito) e IRL (lobo anterior direito);
- **Lobo Lateral Direito (LLL)**, que ocupa cerca de 30% do peso total;
- **Lobo Caudado (CL)**, que ocupa cerca de 10% do seu peso total, sendo constituído por duas porções: o processo caudado (CP) e o lobo Spiegel, que possui uma parte anterior (AC) e posterior (PC).

Da anatomia do lobo médio direito (RML) constam veias hepáticas, veia porta hepática, e sistema biliar, apresentada na figura 3.11 [39].

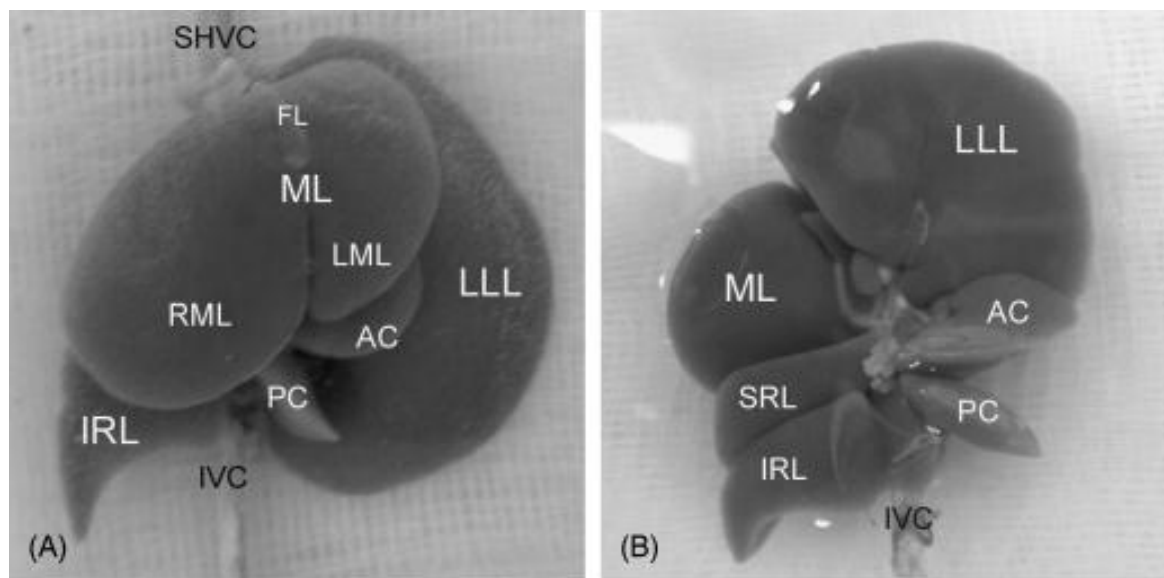


Figura 3.10: Fígado de Rato (A) Vista anterior, (B) Vista inferior (visceral), em que SHVC corresponde à veia cava supra hepática, e IVC à veia cava inferior

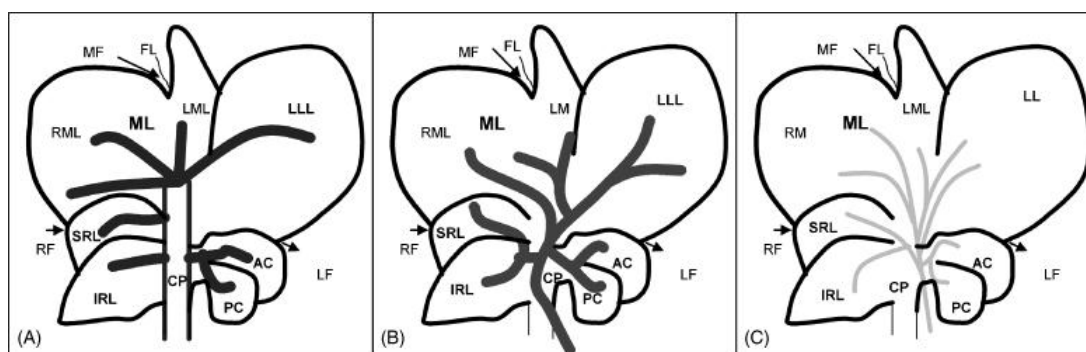


Figura 3.11: Anatomia das veias hepáticas (A), veia porta hepática (B) e sistema biliar (C) no rato

Cada órgão em estudo, foi inserido num tubo de NMR, com diâmetro de 25 mm. Em todos os casos garantiu-se que a posição relativa do órgão era a mesma – a ramificação da veia cava supra hepática ficou sempre colocada voltada para a tampa do tubo de RMN. O passo seguinte foi a colocação de fomblin (óleo utilizado para obtenção de imagem por RM em tecidos/órgãos) no tubo, e em seguida a inserção de cada tubo na sonda de imagem, seguida da sua inserção no espectrómetro.

Face à posição de colocação do órgão no tubo, já referida anteriormente, foram obtidas imagens de cortes axiais, ou seja, com o plano da imagem perpendicular ao campo estacionário, em todos os casos em estudo.

Inicialmente obtiveram-se imagens através da sequência Eco de Spin. No entanto, as imagens obtidas utilizando a sequência Eco de Spin, não apresentaram muito contraste ou definição de estruturas. Utilizou-se uma sequência de Eco de Gradiente, a sequência FLASH para obter imagens dos órgãos.

A técnica de Eco de Gradiente, caracteriza-se pela utilização de um pulso inicial de

RF com um ângulo variável inferior a 90° , o chamado *flip angle*. Por aplicação de um pulso de gradiente bipolar recupera-se a coerência de fase, produzindo-se um sinal de eco. As características do sinal são influenciadas por $T2^*$, e não por $T2$, como acontece na sequência Eco de Spin. A sequência FLASH (*Fast Low Angle Shot*), caracteriza-se por um curto tempo de repetição ($TR < 200ms$), um pequeno *flip-angle* ($< 90^\circ$), e um eco de gradiente para recuperação do sinal. Quando se aplica um *flip-angle* de 90° , converte-se toda a magnetização longitudinal (no eixo z), em magnetização transversal (sinal no eixo xy), enquanto que com um *flip-angle* mais curto, por exemplo de 30° , a quantidade de magnetização transversal é metade ($\sin(30^\circ)$), mas ainda há 87% de magnetização longitudinal ($\cos(30^\circ)$). A magnetização no eixo z irá recuperar com uma taxa determinada por $T1$ durante o intervalo entre pulsos. No entanto, devido ao facto de TR ser curto nesta sequência, a magnetização restante no eixo z , proveniente de pulsos anteriores, torna-se dominante e reduz significativamente o sinal obtido após o pulso de RF seguinte. Relativamente ao efeito das heterogeneidades, este não é compensado, pelo que se devem utilizar curtos tempos de eco se se pretendem obter imagens com alta qualidade. Outra forma que permite a redução dos efeitos das heterogeneidades do campo, é a utilização de vóxeis pequenos, uma vez que isto limita o desfasamento que ocorre no interior de cada voxel. As imagens obtidas com recurso a esta sequência são ponderadas em $T2^*$. No entanto, se são ponderadas em $T2^*$ (cuja contribuição provém de $T2$ puro, mas também das heterogeneidades do campo magnético), também o são em $T2$. Devido ao facto de ser necessária a utilização de TR curtos, a sequência FLASH reduz não só o tempo total da sequência face às outras, mas também limita o número de cortes que se podem obter [10].

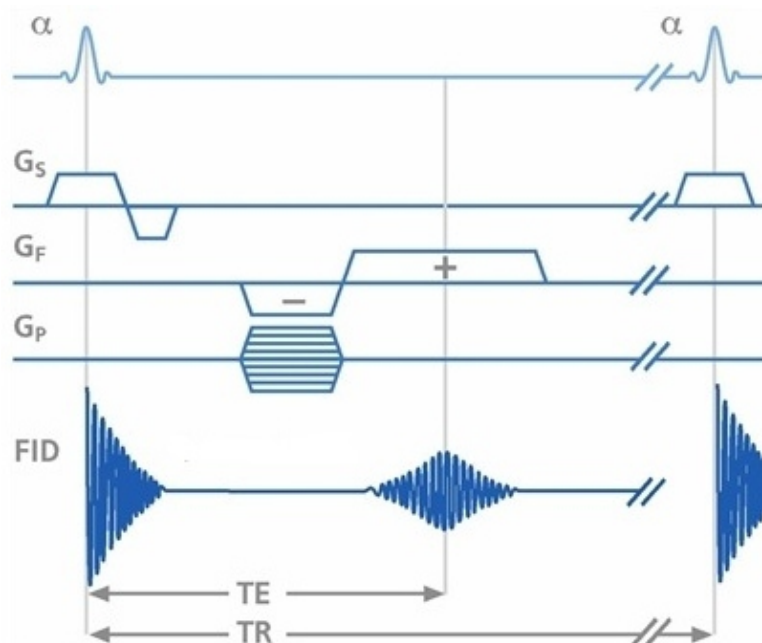


Figura 3.12: Diagrama representativo do procedimento de imagem FLASH

Na figura 3.12 é apresentado um diagrama representativo do procedimento de imagem FLASH. É aplicado um pulso excitador de RF de *flip-angle*, α , menor do que 90° . Um gradiente de seleção de corte, G_S , é aplicado simultaneamente a este pulso. Sendo uma sequência com TR curto, obtém-se uma imagem rápida à custa de uma coerência de fase que não é repostada por um pulso de 180° , mas sim com um gradiente bipolar (G_F), em simultâneo com a aquisição do sinal. O tempo de eco (TE) corresponde ao tempo entre o início do pulso de RF e o máximo de intensidade do sinal, sendo a sequência repetida a cada TR (tempo de repetição) [40].

Foram definidos os parâmetros da sequência FLASH: field of view (FOV) de $3cm$, uma espessura de corte (*slice thickness*) de $1mm$, uma distância entre cortes (*interslice distance*) de $2mm$, e uma matriz de 256×256 . O que permitiu obter imagens com uma resolução de $0,0117cm/pixel$.

Relativamente ao TE utilizado, foi efetuado um estudo, por forma a determinar com qual TE se verificava a obtenção de contraste máximo (pois, tal como referido na introdução teórica, este é um dos fatores que afeta o contraste), o que se verificou em todos os casos para um Tempo de Eco, $TE = 10ms$.

3.2.3 Protocolo para determinação de T2 por Eco de Spin múltiplo com 8 ecos

Foi importante garantir que não houve nenhuma sobreposição entre os cortes selecionados, por forma a que os pulsos de RF utilizados para excitar os diferentes cortes não interferissem uns com os outros e interrompessem a recuperação dos spins em cortes adjacentes, levando a uma redução da razão sinal-ruído e a uma influência da intensidade dos sinais. Em muitas sequências de pulso, entre cada excitação, existe um atraso (TR), para cada corte, enquanto a magnetização recupera. Por forma a fazer melhor uso do tempo total de espera na sequência de pulsos, é possível a excitação de um número de cortes paralelos em cada intervalo de tempo, podendo este procedimento ser repetido para produzir uma série de cortes, cujo número pode ser obtido, dividindo o TR utilizado pelo tempo necessário para cada corte (TE). Se o tempo de repetição for alto, podem ser obtidas não só imagens de vários cortes, mas também diversas imagens com tempos de eco cada vez maiores por corte (imagens adquiridas através de um tempo de eco crescente para cada corte) – a sequência de pulso msme (*multi-slice multi-echo*) [10]. Esta foi a sequência utilizada para a obtenção de T2 através de imagem por Ressonância Magnética, com 8 ecos em todos os casos. Os parâmetros utilizados foram um FOV de $2,72cm$, um corte de espessura de $1mm$, e uma distância entre cortes de $2mm$, matriz de 180×180 , e uma resolução espacial de $0,0151cm/pixel$. Definidos os parâmetros e obtidas as imagens, selecionaram-se ROI's, e foi medida a intensidade de sinal média nessa região para os 8 ecos. A essa intensidade foi ajustada uma lei exponencial cuja constante de tempo é T2.

Resultados e Discussão

4.1 Estudo da Relaxividade dos ML's SPC:Chol

Como referido na introdução teórica, várias partículas têm vindo a ser desenvolvidas com o intuito de poderem ser utilizadas como Agentes de Contraste em IRM. Como tal, um dos principais objetivos da presente dissertação passou pelo estudo da eficiência dos ML's SPC:Chol desenvolvidos como AC's, ou seja, o estudo da sua relaxividade. Como se sabe, partículas de óxido de ferro da ordem dos poucos nanómetros são superparamagnéticas. A campos magnéticos altos, a relaxividade transversal (r_2) deste tipo de partículas é muito maior do que a relaxividade longitudinal (r_1), atuando maioritariamente sobre T2, sendo classificados como AC negativos.

A dimensão dos ML's SPC:Chol foi comprovada por DLS após a fase de extrusão, obtendo-se diâmetros entre 180 – 200nm.

Durante o processo de síntese dos magnetolipossomas, devido ao processo de extrusão e de cromatografia por exclusão molecular, houve perdas de magnetite face à magnetite inicial, pois uma percentagem das partículas iniciais de magnetite ficou retida nas membranas de polycarbonato utilizadas durante a extrusão, e em seguida, aquando da cromatografia, as partículas não incorporadas foram excluídas, resultando numa diminuição na quantidade do óxido de ferro face à inicial. Assim sendo, foi necessário determinar o valor exato de ferro total após o processo de síntese. Estas medidas foram efetuadas por ICP no Laboratório de Análises do IST.

A tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos para as amostras utilizadas na obtenção das relaxividades dos ML's SPC:Chol.

Tabela 4.1: Valores das concentrações das diferentes amostras após diluições

Amostra	C(mM/Fe)
SPC:Chol 1:0	0
	0.009
	0.018
	0.036
	0.072
	0.144
SPC:Chol 1:0.5	0
	0.024
	0.072
	0.144
SPC:Chol 1:1	0.058
	0.078
	0.117
	0.234

4.1.1 Determinação da Relaxividade Longitudinal por Espectroscopia de RMN

Verificou-se para todas as amostras em estudo, que a evolução da intensidade do sinal segue a equação seguinte:

$$I(t) = I(0)(1 + p * \exp(-\frac{t}{T_1})) \quad (4.1)$$

Em que p corresponde a um parâmetro negativo. O Software *Topspin NMR* da *Bruker* permitiu determinar o tempo de relaxação T_1 , obtido através do ajuste da expressão anterior. Os valores obtidos para T_1 encontram-se apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Resultados obtidos para a constante T_1 das diferentes amostras

Amostra	C(mM/Fe)	T_1 (s)
SPC:Chol 1:0	0	3.324
	0.009	3.319
	0.018	3.218
	0.036	3.371
	0.072	3.271
	0.144	3.082
SPC:Chol 1:0.5	0	3.211
	0.024	3.299
	0.072	3.290
	0.144	3.240
SPC:Chol 1:1	0.058	3.065
	0.078	3.071
	0.117	3.03
	0.234	3.073

Obtidos os valores de T_1 , foi então possível determinar o valor da relaxividade r_1 . Tal como referido na introdução teórica, a relaxação longitudinal (R_1) ou seja, o inverso do tempo de relaxação T_1 , segue a seguinte expressão 2.9, ou seja:

$$R_1 = r_1[AC] + R_{10}$$

em que $[AC]$ corresponde à concentração do agente de contraste em $mmol/litro(mM)$, r_1 é a relaxividade longitudinal em $mM^{-1}s^{-1}$, e R_{10} corresponde à relaxação para uma concentração nula de agente de contraste. Tal como referido na introdução teórica, esta expressão pode ser aplicada quando a relaxação dos prótons se deve a interações dipolares (interação próxima entre cada partícula magnética individual e as moléculas de água no meio), pelo que o agente de contraste se deve encontrar uniformemente distribuído no meio em que se encontra, motivo pelo qual se agitou cada amostra em estudo antes da sua colocação no espectrómetro.

A taxa de relaxação longitudinal em função da concentração do potencial AC encontra-se apresentada nas representações gráficas das figuras 4.1, 4.2 e 4.3 para as três composições estudadas.

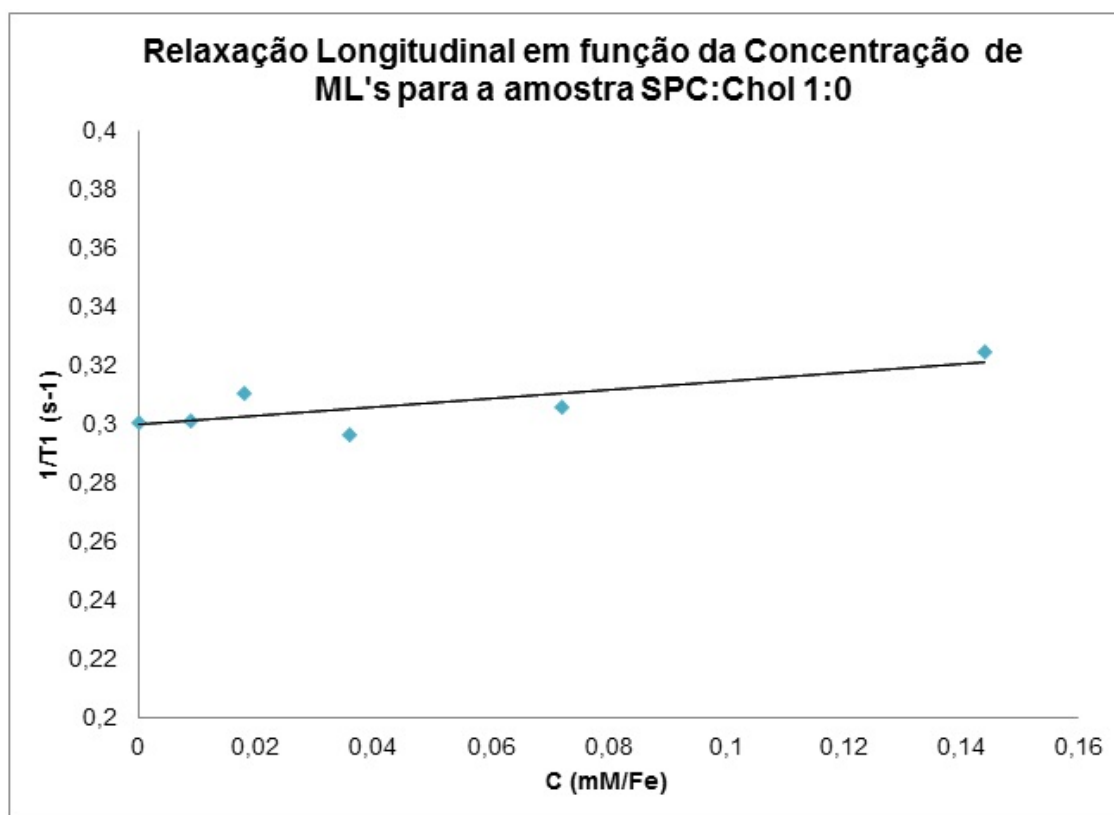


Figura 4.1: Taxa de relaxação Longitudinal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0

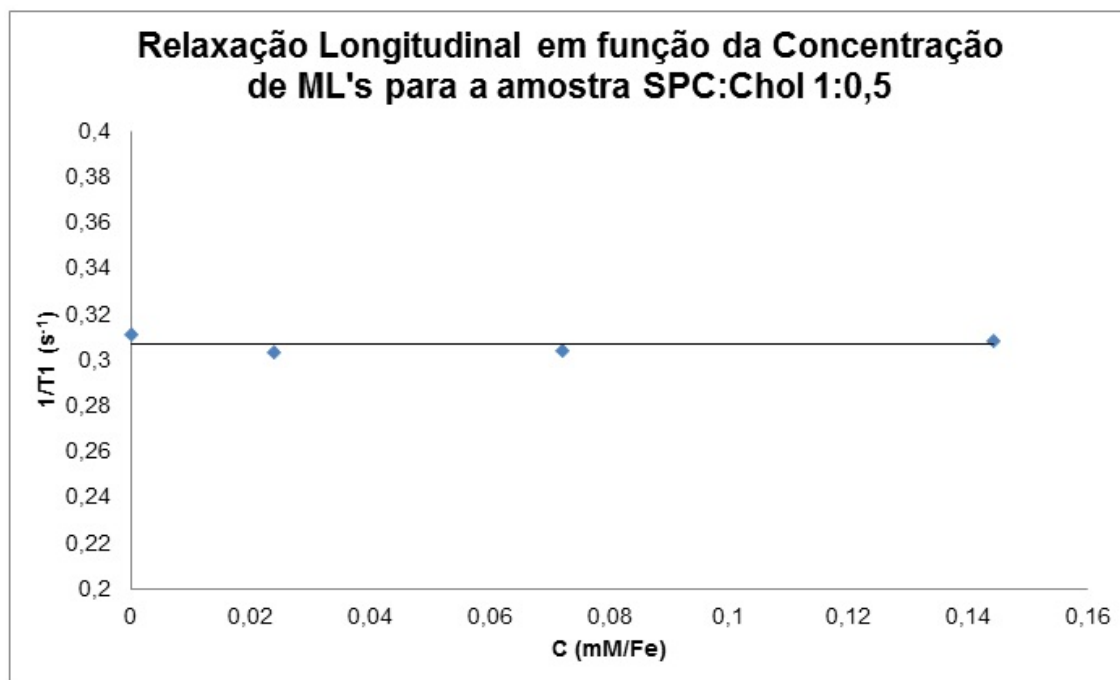


Figura 4.2: Taxa de relaxação Longitudinal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0,5

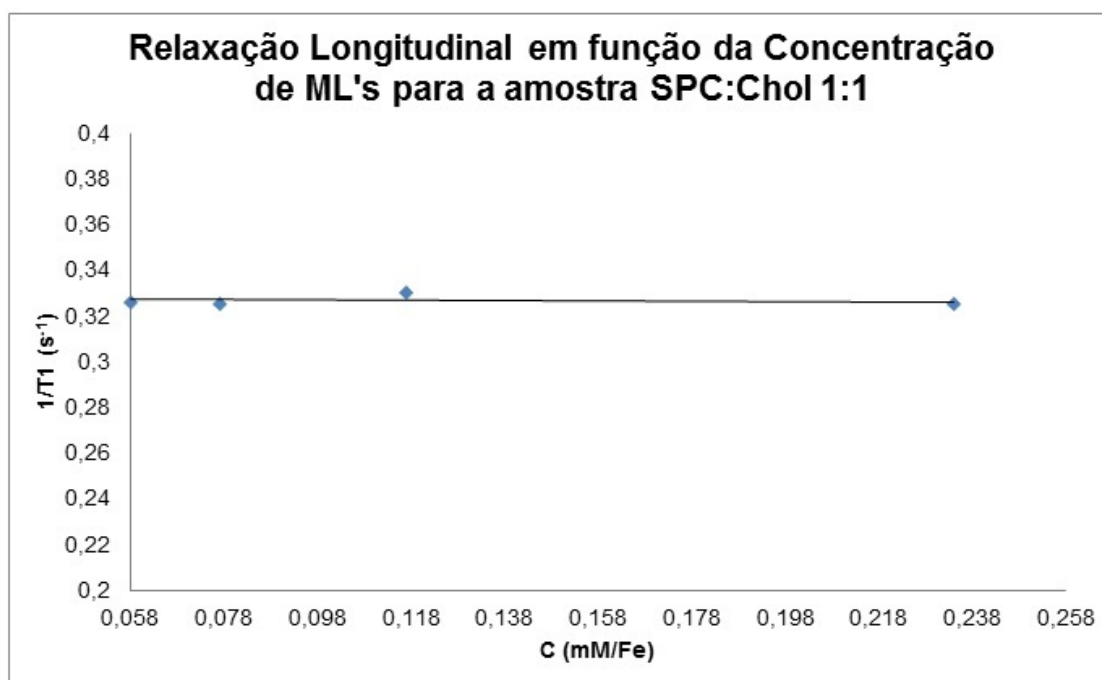


Figura 4.3: Taxa de relaxação Longitudinal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:1

Para as três formulações em estudo, verificou-se que a regressão linear obtida para a relaxação longitudinal em função da concentração de ML's SPC:Chol apresenta um declive muito pequeno, devido a uma pequena variação dos valores da constante de

tempo T1, possuindo assim a relaxividade longitudinal um valor muito reduzido, para um campo magnético aplicado de 7 Tesla.

O valor de T1 varia com o campo magnético aplicado, influenciando o contraste em imagens obtidas por IRM, pelo que não é possível fazer comparação entre valores de constantes T1 obtidos a diferentes campos magnéticos. É necessário referir sempre a que campo se está a trabalhar [10]. Assim sendo, a comparação com valores referidos na literatura não foi possível visto não haver estudos com este tipo de nanopartículas a campos de 7 Tesla, tornando assim este estudo pioneiro para campos tão elevados.

Foi efetuado também o estudo da determinação da relaxividade longitudinal por Imagem por Ressonância Magnética, obtendo-se valores concordantes com os obtidos por espectroscopia de RMN.

4.1.2 Determinação da Relaxividade Transversal por Espectroscopia de RMN

Verificou-se para todos os casos, que a evolução temporal de M_{xy} , seguiu um decaimento exponencial. Mais uma vez, o Software *Topspin NMR* da *Bruker* permitiu determinar o tempo de relaxação T2, em segundos, ajustando a expressão:

$$I(t) = P * \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (4.2)$$

aos valores da intensidade do sinal. Os valores obtidos para T2 encontram-se apresentados na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Resultados obtidos para a constante T2 das diferentes amostras

Amostra	C(mM/Fe)	T2(s)
SPC:Chol 1:0	0	2.179
	0.009	1.517
	0.018	0.8681
	0.036	0.1386
	0.072	0.08967
	0.144	0.05004
SPC:Chol 1:0.5	0	1.836
	0.024	0.5044
	0.072	0.2006
	0.144	0.10798
SPC:Chol 1:1	0.058	0.3138
	0.078	0.2316
	0.117	0.1619
	0.234	0.10868

Verificou-se que com o aumento da concentração do óxido de ferro, o valor de T2 diminuiu. Análogo ao estudo anteriormente realizado, foi possível em seguida determinar o valor da relaxividade transversal. A relaxação transversal (R2) que corresponde ao inverso do tempo de relaxação T2, segue a expressão 2.10, já apresentada anteriormente, ou seja:

$$R2 = r2[AC] + R2_0$$

em que, mais uma vez, $[AC]$ corresponde à concentração do agente de contraste em $mmol / litro$ (mM), $r2$ é a relaxividade transversal em $mM^{-1}s^{-1}$, e $R2_0$ corresponde à relaxação para uma concentração nula de AC. Mais uma vez, para a utilização desta expressão, foi importante garantir que os ML's se encontravam uniformemente distribuídos, agitando-se para tal cada amostra antes da sua colocação no espectrómetro.

A taxa de relaxação transversal em função da concentração do potencial AC encontra-se apresentada nas representações gráficas das figuras 4.4, 4.5 e 4.6 para as três composições estudadas, nos quais se apresentam já as retas ajustadas aos resultados experimentais.

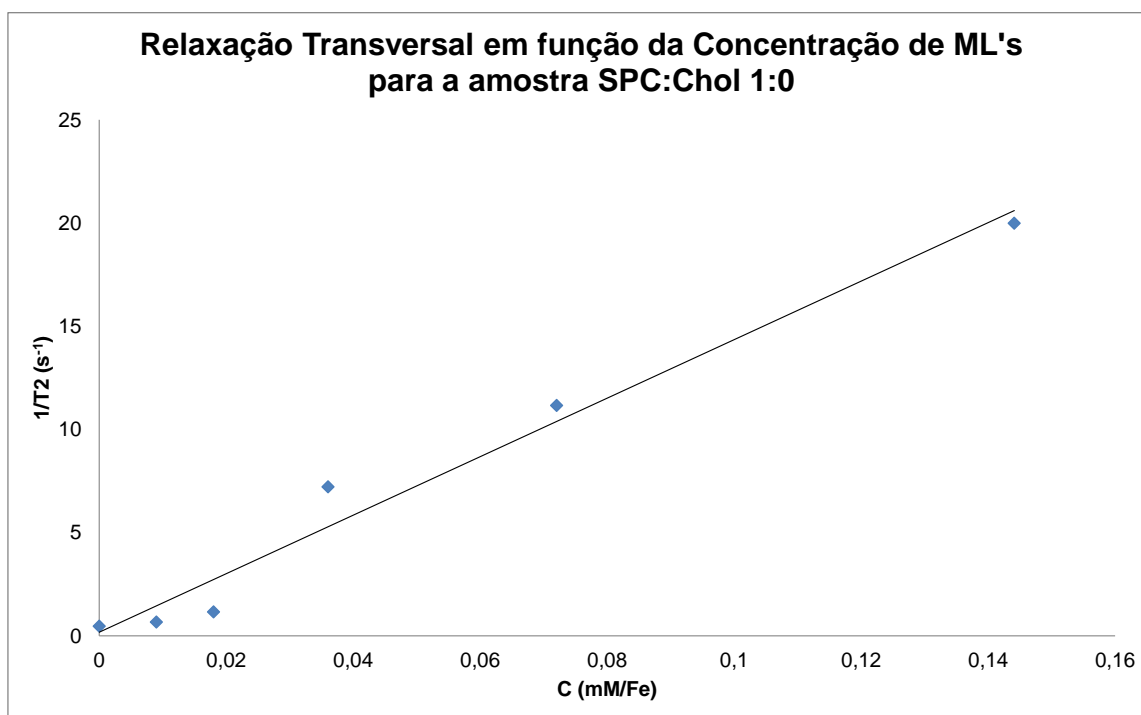


Figura 4.4: Taxa de relaxação Transversal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0

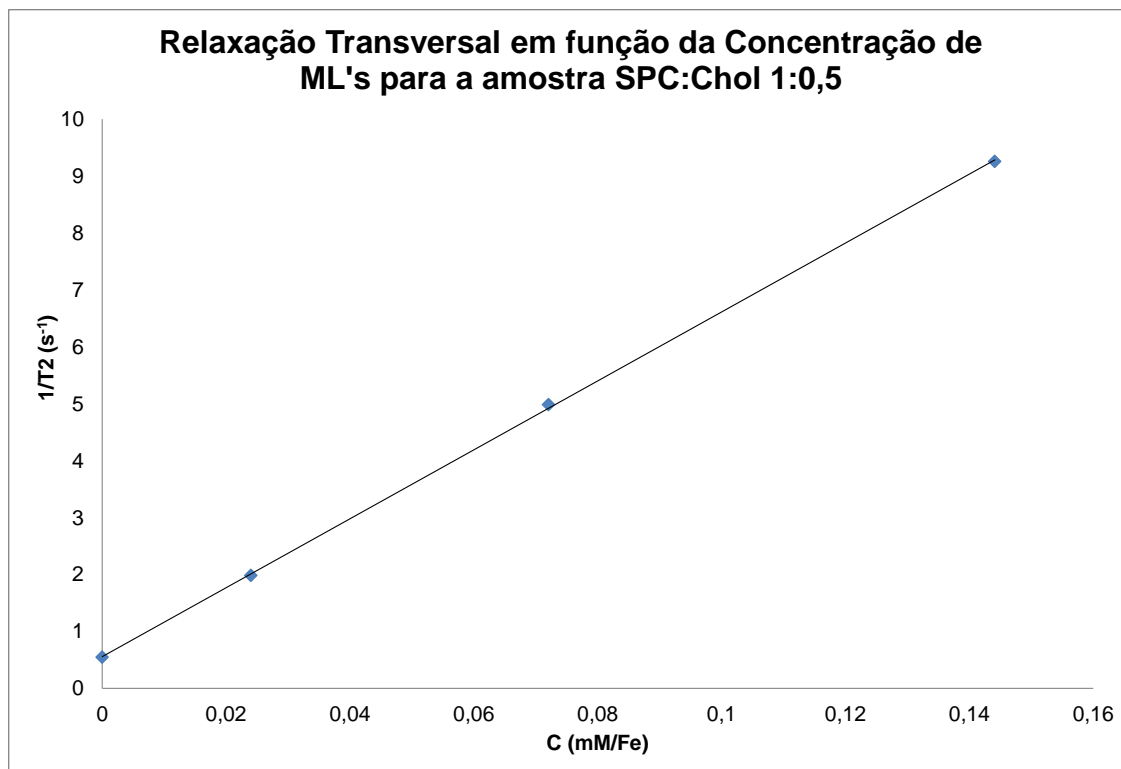


Figura 4.5: Taxa de relaxação Transversal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:0.5

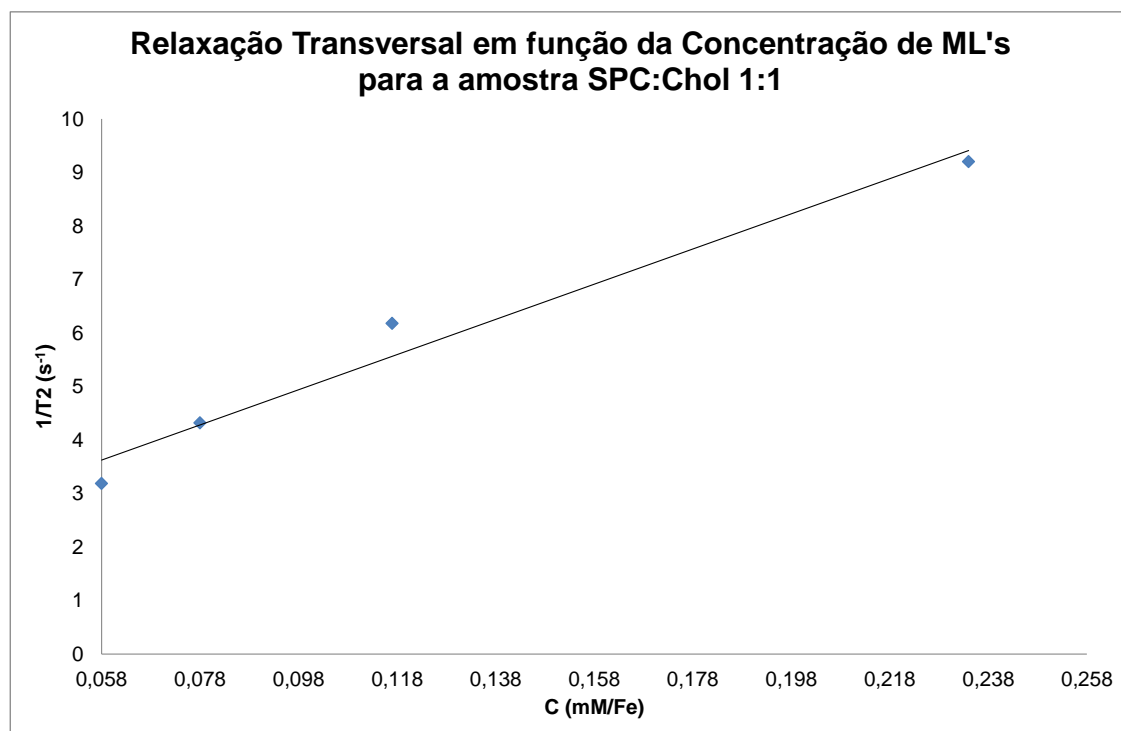


Figura 4.6: Taxa de relaxação Transversal em função da concentração de ML's para a amostra SPC:Chol 1:1

Na tabela 4.4 constam os valores obtidos para a relaxividade transversal das amostras ML SPC:Chol.

Tabela 4.4: Resultados obtidos para r_2 das diferentes amostras

Amostra	$r_2(mM^{-1}s^{-1})$
SPC:Chol 1:0	143.69 ± 9.9
SPC:Chol 1:0.5	61.7 ± 0.96
SPC:Chol 1:1	33.5 ± 4.2

Face aos valores obtidos verificou-se que a amostra sem colesterol na sua composição apresenta a relaxividade transversal mais elevada.

Mais uma vez, tal como no caso da relaxividade longitudinal, foi efetuado o estudo da determinação da relaxividade transversal por IRM, obtendo-se valores concordantes com os obtidos por espectroscopia.

4.1.3 Potencial utilização como Agente de Contraste

Para as amostras ML's SPC:Chol, o valor da relaxividade longitudinal apresentou-se muito pequeno. Este valor foi concordante com o referente na literatura, na medida em que se afirma que quando o campo magnético aplicado é suficientemente elevado (neste caso foi de 7 Tesla), a relaxividade longitudinal de nanopartículas de magnetite tende para zero [18]. Analisando apenas os valores obtidos para a relaxividade longitudinal, afere-se a sua eficiência como AC Positivo. Assim concluiu-se que as amostras em estudo, não podem ser utilizadas como agentes Positivos, na medida em que não se verifica diminuição dos tempos de relaxação T1.

A relaxividade transversal mede a eficiência do AC para ser utilizado como agente Negativo. Tal como referido na introdução teórica (2.2.2), se num Agente de Contraste se verifica um efeito maioritariamente sobre a relaxação T2, como se verifica no caso de AC's superparamagnéticos, este será classificado como AC Negativo [18]. É possível concluir que as amostras com diferentes formulações estudadas, podem ser classificadas como AC's Negativos para IRM.

É também referido na introdução teórica que qualquer agente de contraste que diminui T1, diminui também T2, mas que a condição contrária não é necessariamente verdadeira [11], o que se comprovou no caso em estudo, em que se verificou diminuição de T2, mas não se verificou alteração nos valores de T1.

Analisando os valores obtidos para as relaxividades transversais das diferentes amostras, verificou-se que com o aumento da quantidade de colesterol na camada lipídica de SPC, que encapsula as nanopartículas de magnetite, o valor de r_2 diminuiu (figura 4.7), pelo que se concluiu que a eficiência como AC's para os magnetolipossomas desenvolvidos é maior para a formulação sem colesterol.

O efeito do colesterol na relaxividade de um sistema, a nível de Agentes de Contraste Positivos contendo partículas paramagnéticas, nomeadamente o Gadolínio (Gd^{3+})

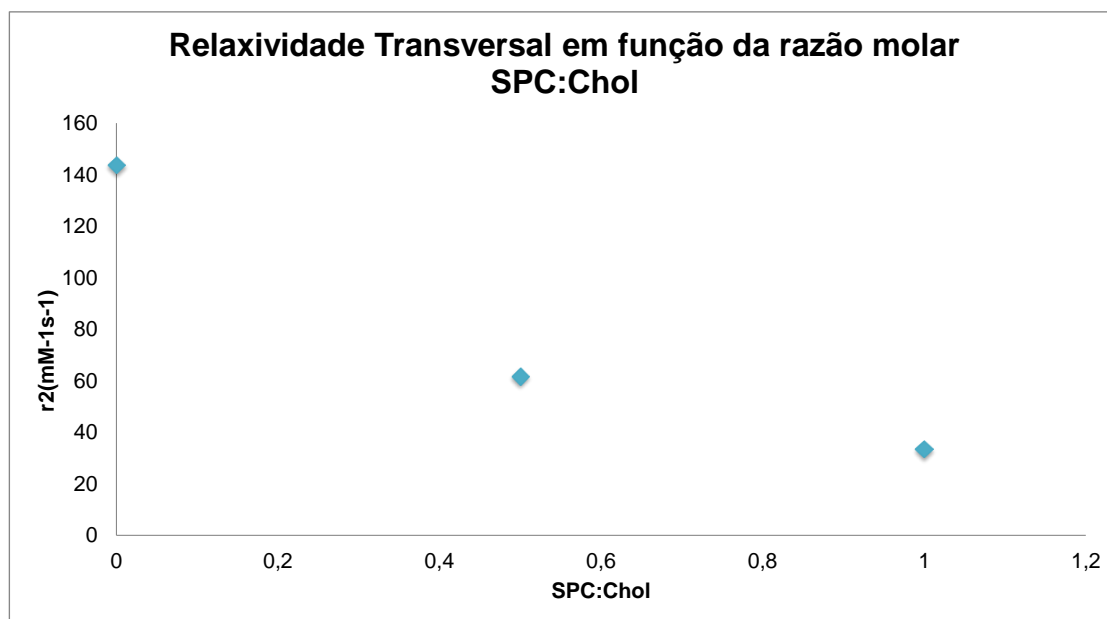


Figura 4.7: Relaxividade Transversal em função da razão molar SPC:Chol

encapsulado por lipossomas, é referido em estudos para a relaxividade longitudinal [41, 42, 43]. Nestes estudos, verificou-se que os lipossomas contendo colesterol na sua membrana, apresentavam uma menor relaxividade longitudinal do que os que não continham colesterol. Os autores sugerem que este facto será devido à diminuição do coeficiente de permeabilidade da membrana causado pela presença de colesterol na membrana lipídica, limitando assim a troca de água. De forma análoga foi possível compreender os valores obtidos na presente dissertação, pois a permeabilidade da membrana depende da composição de lípidos e pode ser alterada variando o nível de saturação e comprimento das cadeias de lípidos e pela incorporação de colesterol. Uma variação da permeabilidade da membrana leva a alteração da sua relaxividade [44]. Assim sendo, com a adição de colesterol à membrana, intercalada com os fosfolípidos, verificou-se diminuição da permeabilidade da membrana, tornando-a mais rígida, e levando a uma diminuição da flexibilidade da cadeia lipídica, pelo que, a troca de água entre o exterior e o interior dos magnetolipossomas fica condicionada, levando a uma diminuição da relaxividade transversal, diminuindo a eficiência dos magnetolipossomas a serem utilizados como Agentes de Contraste Negativos.

O magnetolipossoma com a formulação SPC:Chol 1:0, ou seja, sem colesterol na camada lipídica de SPC, tem um melhor potencial para ser utilizado como Agente de Contraste Negativo em IRM do que as restantes formulações desenvolvidas neste trabalho, possuindo um valor de $r_2 = 143,69 \pm 9,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. A maioria dos estudos de relaxividade para Agentes de Contraste ocorre a campos magnéticos mais baixos do que o utilizado no presente trabalho, sendo que alguns destes constam na tabela 2.1, presente na introdução teórica. Destes AC's, os MF, MFL-PEG, e Stealth-ML, são magnetolipossomas. Assim sendo, na tabela 4.5 constam os seus valores das relaxividades, e também os

valores obtidos no presente trabalho, por forma a facilitar a sua comparação.

Tabela 4.5: Comparação de relaxividades de nanopartículas semelhantes, já estudadas, com as da presente dissertação

Potencial AC	$r1(mM^{-1}s^{-1})$	$r1(mM^{-1}s^{-1})$	B(T)
MFL	10	67	0.47
MFL-PEG	18.6	116	0.47
Stealth-ML	3	240	1.5
ML SPC:Chol 1:0	0	143.69	7
ML SPC:Chol 1:0.5	0	61.7	7
ML SPC:Chol 1:1	0	33.5	7

Comparando estes valores, verificou-se que o magnetolipossoma com a formulação SPC:Chol 1:0 apresenta melhor eficiência como Agente de Contraste Negativo do que o MFL e MFL-PEG. Comparativamente ao AC Stealth-ML, este apresenta melhor eficiência do que os magnetolipossomas desenvolvidos. No entanto, todos estes valores foram obtidos a campos magnéticos diferentes, mas o valor da relaxividade transversal de óxidos de ferro, apresenta um aumento, com o aumento do campo magnético aplicado, atingindo a partir de um certo campo aplicado, um valor de saturação, mantendo-se a relaxividade, a partir deste ponto, no mesmo patamar de valor [45], sendo assim aceitável comparar estes valores.

Este estudo a 7T foi importante na medida em que hoje em dia, cada vez mais, a IRM clínica, têm tendência a evoluir para campos magnéticos cada vez maiores, sendo portanto necessária a existência de estudos de relaxividade de potenciais AC's a campos maiores, tal como na presente dissertação.

O uso de lipossomas apresenta inúmeras vantagens, tais como: serem biocompatíveis; poderem integrar na sua membrana partículas insolúveis em água, ou no seu interior partículas solúveis em água; quando um fármaco se encontra lá incorporado, encontra-se protegido do efeito de condições adversas exteriores, não levando a reações adversas no corpo humano; o seu tamanho, carga e propriedades podem ser facilmente alterados, pela adição de novos ingredientes ou alteração dos métodos, na sua produção [46]. No entanto, os lipossomas podem ser removidos da corrente sanguínea em alguns minutos, pelo que a incorporação de PEG na sua bicamada pode contornar esta limitação, como os ML's estudados na segunda parte da presente dissertação - ML's C. Para que o uso de lipossomas seja aceite em diagnóstico clínico devem ser garantidas algumas condições tais como: que estes sejam estáveis *in vivo*, sem libertação de nenhuma das substâncias que se encontram incorporadas, ou que sejam estáveis a nível do seu armazenamento, dentro dos limites aceitáveis [21].

4.2 Estudo do comportamento de magnetolipossomas, por IRM, em órgãos

Os objetivos principais desta segunda parte do trabalho foram a obtenção e quantificação da qualidade da imagem obtida por IRM, de órgãos de animais aos quais se administraram por meio intravenoso ML's C, por forma a aferir da sua potencialidade como AC's negativos.

A modificação de superfícies de nanopartículas através da ligação covalente ao polímero polietileno glicol (PEG) confere uma estabilização que permite a diminuição do reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear (que iria reter as nanopartículas e digeri-las enzimaticamente) e um tempo de circulação na corrente sanguínea mais prolongado, sendo que se pensa que o fator chave que determina esta última característica referida é a densidade de superfície do PEG [40]. A característica de prolongar o tempo de circulação do sangue, por forma a garantir que não passe diretamente para os tecidos, foi o motivo pelo qual se fez a ligação do PEG à fosfatidicolina de ovo. Estas deverão manter-se em circulação durante cerca de 24h na corrente sanguínea, conforme referido na literatura, através de um estudo efetuado com magnetolipossomas com formulação semelhante aos apresentados na presente dissertação, MFL-PEG, e que se encontram apresentados na tabela 2.1. Estes revelaram-se altamente estáveis *in vivo*, não tóxicos, e com um longo tempo de circulação na corrente sanguínea [21].

Os ratos são muito utilizados para diversas experiências no âmbito científico, visto a sua fisiologia ser semelhante à dos humanos, serem fáceis de manejar e pouco dispendiosos. Posto isto, e com vista ao estudo aqui desenvolvido, pretendia-se que o mesmo pudesse ser realizado no *Espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHz Avance III*, existente no CENIMAT/i3N, e assim sendo, um lobo do fígado foi o órgão utilizado.

Seguido o protocolo enunciado no capítulo anterior, foi possível a obtenção das imagens. Para cada órgão realizou-se um estudo com vista a determinar o parâmetro Tempo de Eco (TE) ótimo, de forma a obter o máximo de contraste possível em todas as imagens obtidas, obtendo-se para todas um Tempo de Eco ótimo de 10ms. A sequência de pulso utilizada para a sua obtenção foi uma sequência rápida de Eco de Gradiente – FLASH, tendo-se também comparado esta com uma sequência de Eco de Spin, mas chegou-se à conclusão que as imagens com melhor qualidade e contraste foram obtidas com a primeira. Isto dever-se-á ao facto de a sequência FLASH ter influência dos campos locais, levando a um sinal mais afectado em T2*, o que não se verifica com a sequência Eco de Spin cuja influência provém de T2 puro.

Ao nível do fígado, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro vão diminuir a intensidade do sinal nos tecidos normais da parte funcional do fígado, em imagens ponderadas em T2 ou T2*. Devido ao facto de a maioria das lesões no fígado não apresentarem um sistema reticuloendotelial normal, a intensidade do seu sinal não é

alterada, pelo que o contraste entre tecidos normais do fígado é aumentado [12]. Assim sendo, espera-se que com o uso dos ML's C, e após a indução de uma lesão no órgão, o contraste entre os tecidos normais e os que sofreram o dano seja aumentado, visualizando-se o dano provocado.

A avaliação da qualidade das imagens obtidas foi efetuada no computador principal do sistema de RMN, apresentando-se com elevada resolução no seu display, sendo possível uma melhor distinção das estruturas presentes. No entanto, nas imagens aqui apresentadas não é possível a distinção tão clara das diferentes estruturas face às apresentadas no display do computador do operador.

4.2.1 Estudo de casos com isquemia hepática por IRM

Os ratos foram sujeitos a isquemia no fígado, ou seja, a suspensão da circulação local sanguínea, bloqueando-se uma artéria, por 30 minutos, e em seguida deixou-se recuperar o rato, garantindo que o dano provocado não conduziu à sua morte. Ao fim de 24h foram sacrificados e cada órgão foi conservado em formol. Segundo apresentado na literatura [47], o efeito do formol nas imagens obtidas por IRM é de diminuir a qualidade das imagens obtidas. Sendo no entanto referido que este efeito não é significativo, pelo que não foi considerado o mesmo no presente estudo.

A lesão de isquemia hepática induzida por complicações vasculares contribui para a falência precoce do órgão, podendo levar à rejeição aguda e crónica após um transplante hepático [48]. Neste contexto, a lesão provocada foi controlada de forma a simular o dano mínimo existente num transplante hepático, esperando uma lesão controlada nas células de Kupffer, e que não se propagasse aos hepatócitos. O esperado seria que o contraste administrado se depositasse maioritariamente nestas regiões, sendo removido da corrente sanguínea após 24h.

Para a obtenção de imagens por RM, foi utilizado como lobo de estudo, o lobo médio direito (RML). Os órgãos foram colocados em fomblin pois este não apresenta sinal de RM, e possui suscetibilidade magnética com valor próximo dos tecidos, garantindo assim que não surjam artefactos nas imagens. Em todos os casos foram obtidas 18 imagens provenientes de diferentes cortes, todas com a mesma resolução. As imagens provenientes de cortes centrais foram as escolhidas para estudo, analisando-se 3 cortes para cada caso.

Inicialmente foram estudados os casos A e B, ambos com um protocolo cirúrgico idêntico ao nível da isquemia hepática, mas no caso B houve administração de magnetolipossomas.

Em relação ao caso A, as imagens correspondentes aos cortes 8, 9 e 10, respetivamente, encontram-se apresentadas nas figuras 4.8, 4.9 e 4.10. Para o caso B, foram igualmente estudados os mesmo cortes, obtendo-se as imagens apresentadas nas figuras 4.11, 4.12 e 4.13,

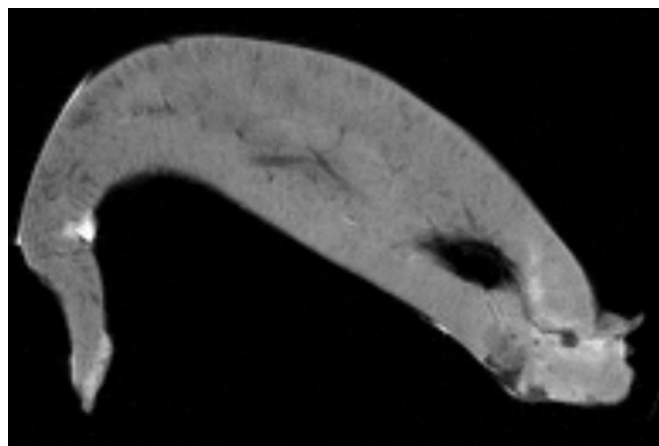


Figura 4.8: Imagem obtida por IRM para o caso A, corte 8

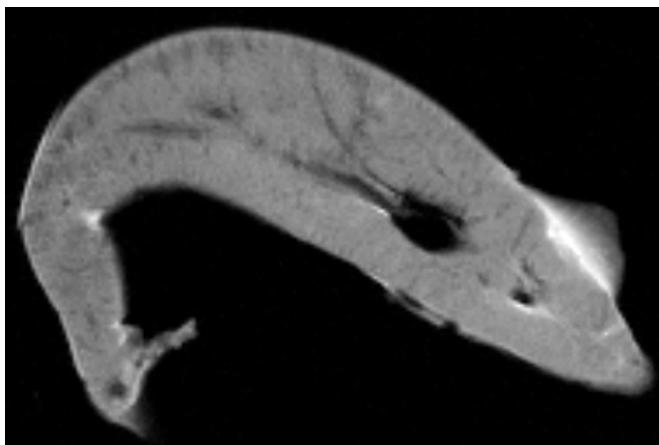


Figura 4.9: Imagem obtida por IRM para o caso A, corte 9

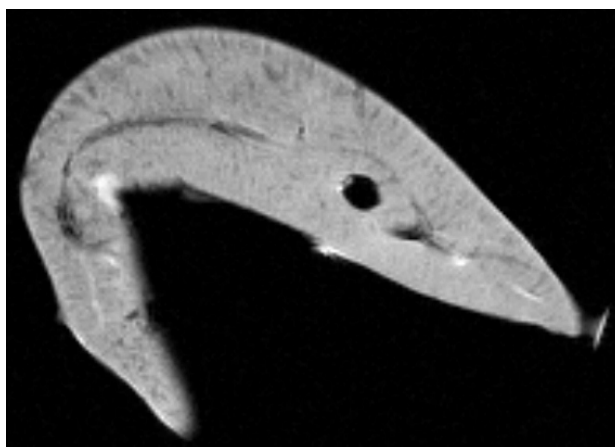


Figura 4.10: Imagem obtida por IRM para o caso A, corte 10

No caso B verificou-se grande heterogeneidade e vascularização mais evidente nas zonas mais periféricas.

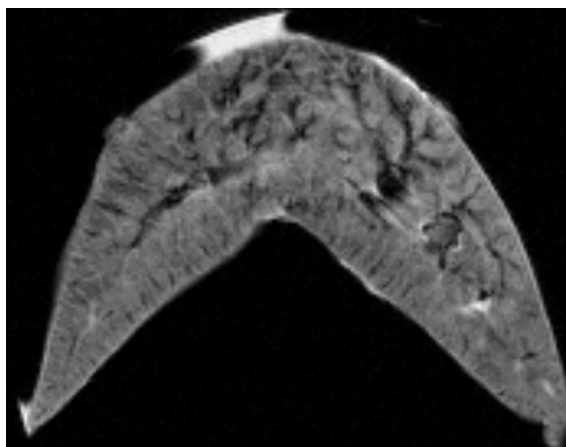


Figura 4.11: Imagem obtida por IRM para o caso B, corte 8

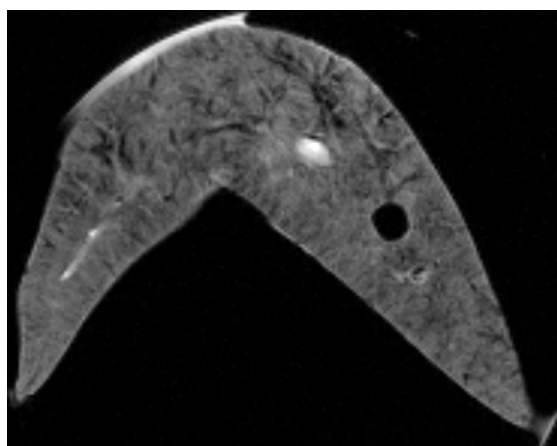


Figura 4.12: Imagem obtida por IRM para o caso B, corte 9

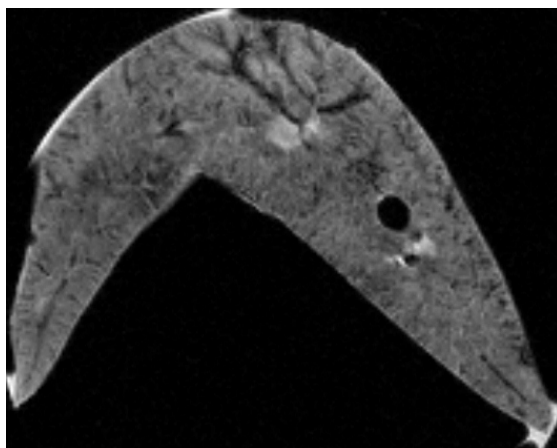


Figura 4.13: Imagem obtida por IRM para o caso B, corte 10

Comparando os dois casos, numa primeira análise, e apenas comparando a "olho nú", foi possível a afirmação de que se visualizaram mais estruturas, melhor contraste e mais detalhe no caso em que houve administração intravenosa de ML's C, ou seja, no caso B. No caso B, uma possibilidade para o aspeto das imagens obtidas, é o de que as zonas em que há menos sinal, ou seja, mais escuro, poderão corresponder a zonas de maior isquemia, ao nível da irrigação capilar, visto que o AC desenvolvido deverá aumentar o contraste nestas zonas face aos tecidos normais. Relativamente à vascularização evidenciada nas imagens, no caso A as imagens apresentam maior homogeneidade, sendo que com administração de ML's C - caso B - surgiu a evidência de maior vascularização, principalmente na periferia.

4.2.1.1 Avaliação da qualidade das imagens

Procedeu-se à quantificação da qualidade das imagens obtidas. Diferentes parâmetros são utilizados para avaliar a qualidade de uma imagem. Numa região de interesse homogénea, o valor médio do sinal de um pixel pode ser considerado como uma boa aproximação do sinal proveniente do voxel correspondente.

O tamanho de um voxel e de um pixel vão influenciar a resolução espacial, e portanto, o contraste. Todas as estruturas anatómicas presentes no interior de um voxel contribuem para a intensidade do sinal na imagem, pelo que se um voxel possui grande volume, pode conter diferentes estruturas e tipos de tecidos, mas em cada pixel da imagem final, estes são indistinguíveis. Utilizando a matriz referida no capítulo anterior, de 256×256 , garantiu-se que o tamanho de cada voxel foi mantido o mais pequeno possível, de forma a que menos estruturas se encontrassem representadas num único pixel, levando assim a assim a uma melhoria da resolução espacial e do contraste. Deve notar-se no entanto, que quanto maior for o tamanho de um voxel, maior será o sinal e a razão sinal-ruído [10].

Para tal, selecionou-se uma região de interesse (ROI) com o mesmo tamanho para todos os cortes em estudo. Em anexo A encontram-se apresentadas as ROI selecionadas. Dentro de cada região, quantificou-se inicialmente o número de zonas distintas visíveis, correspondendo estas a diferentes zonas cujo histograma apresentasse diferentes valores da intensidade do sinal. Na tabela seguinte constam os valores obtidos.

Tabela 4.6: Número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo

Caso	Corte	NºZonas distintas
Caso A	6	6
	7	8
	8	8
Caso B	6	24
	7	26
	8	22

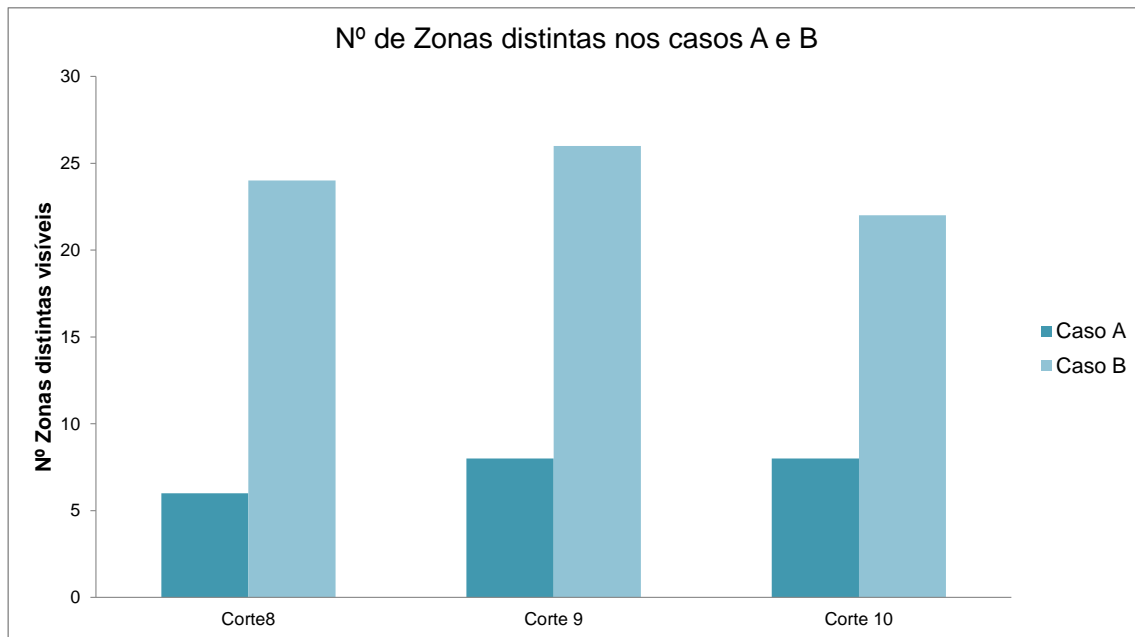


Figura 4.14: Representação gráfica do número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo

Através da representação gráfica apresentada na figura 4.14, constatou-se a identificação de maior número de estruturas no caso do animal em que foram administrados ML's C, sendo este número superior ao dobro do obtido para o caso sem administração.

Selecionando-se uma ROI estudou-se a intensidade do sinal, sendo possível determinar o valor médio (μ) e desvio padrão (σ) da intensidade.

O contraste entre duas regiões distintas corresponde à diferença entre o valor do sinal nestas duas regiões. Se não houver diferença de intensidade do sinal entre duas zonas adjacentes, estas não podem ser distinguidas, e por consequência, nenhum contraste é verificado. Quanto maior a diferença de intensidade entre duas zonas adjacentes, melhor será o contraste verificado. Considerando duas regiões distintas, A e B, o contraste entre elas é definido como:

$$C_{AB} = S_A - S_B \quad (4.3)$$

Em que S_A e S_B , correspondem ao sinal dos pixels na região A e B, respetivamente [49].

Numa análise mais detalhada, dentro de cada ROI, foi analisada qual a intensidade do sinal entre zonas distintas, sendo assim possível a obtenção da quantificação do contraste e aferir acerca da qualidade da imagem. Em seguida encontram-se apresentados os valores da intensidade dos pixels em regiões escolhidas, distintas mas adjacentes, dentro do ROI já referido anteriormente (sendo que as siglas μ_+ e μ_- correspondem à intensidade do sinal mais intenso e menos intenso em estudo, respetivamente), seguido do cálculo do contraste entre as mesmas, e do valor final médio do contraste obtido para as regiões adjacentes estudadas nos três cortes considerados (μ contraste). Garantiu-se que o valor médio do sinal obtido provinha de uma região com pouca dispersão de valores

de intensidade. As tabelas seguintes apresentam os resultados obtidos.

Tabela 4.7: Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso A, nos cortes em estudo

	Corte 8			Corte 9			Corte 10		
	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste
Caso A	103.9	78.9	25	117	64.9	52.1	147	117	30
	119	73.5	45.5	122	95.5	26.5	139	81.3	57.7
	107	87	20	124	90.3	26.5	151	136	15
				123	101	22	146	119	27
$\mu_{contraste}$			30.2			31.8			32.4

Tabela 4.8: Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso B, nos cortes em estudo

	Corte 8			Corte 9			Corte 10		
	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste
Caso B	110	39	71	160	88	72	122	27.8	94.2
	109	33.7	75.3	91.6	55.2	36.4	141	86.5	54.5
	101	68.1	32.9	83.1	61.2	21.99	99	30	69
	98.9	52.2	46.7	103	70.5	32.5	121	76.7	44.3
	94.9	35.9	59	91.8	54.5	37.3	87	54.9	32,1
	102	48.2	53.8	111	63	48	97.3	79.5	17.8
	130	99	31	90.5	70.1	20.4	128	67	61
	90.6	3.2	87.4	95.8	62.8	33	112	73.3	38.7
	136	90.1	45.9	100	77.4	22.6	110	62.2	47.8
	99.2	49	50.2	98.1	54.3	43.8	138	78.5	59.5
	122	72.3	49.7	101	67.8	33.2	117	98.6	18.4
	95.9	49	46.9	97.3	63	34.3			
				95.6	60.2	36.3			
$\mu_{contraste}$			54.2			36.3			48.8

Analisando os valores obtidos para o contraste, verificou-se que para os 3 cortes em estudo, este é maior no caso B, ou seja, no caso em que foram administrados ML's C, podendo-se concluir que o contraste, na imagem do órgão que esteve sujeito ao potencial AC melhora, tal como se pode constatar pela representação gráfica 4.15 em que se compararam os dois casos.

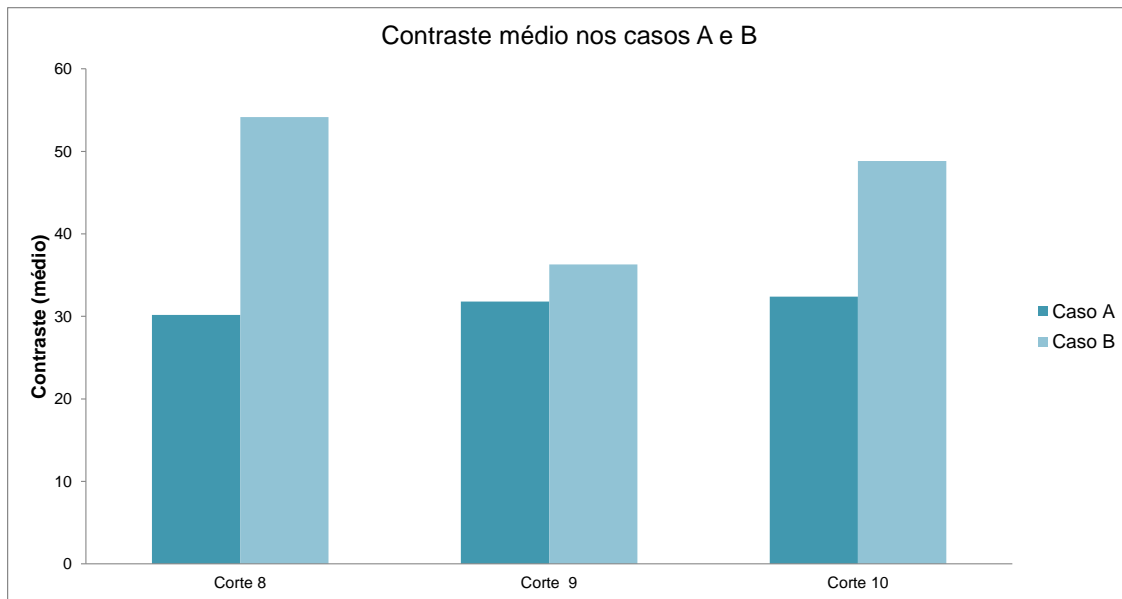


Figura 4.15: Representação gráfica do Contraste médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo

Um outro parâmetro passível de quantificar a qualidade da imagem é a razão contraste-ruído (CNR). Por vezes, quando o contraste é elevado, mas o ruído é demasiado grande, a diferença de sinal entre duas regiões distintas pode não ser perceptível para o olho humano. Assim sendo, torna-se importante definir a razão entre o contraste e o desvio padrão do ruído, denominada por razão contraste-ruído (CNR). Esta razão é definida, para duas regiões de interesse distintas A e B, como [36]:

$$CNR_{AB} = \frac{C_{AB}}{\sigma_0} = \frac{S_A - S_B}{\sigma_0} = CNR_A - CNR_B \quad (4.4)$$

Para tal, para cada imagem em estudo, foi selecionada uma ROI fora do objeto em estudo, onde não houvesse sinal, e determinado o desvio padrão, σ_0 , da intensidade do sinal. Tal como referido anteriormente a CNR corresponde à razão entre o contraste e σ_0 . As tabelas seguintes apresentam os resultados obtidos.

Tabela 4.9: Valores de σ_0 nos casos A e B, nos cortes em estudo

Caso A	Corte 8	$\sigma_0 = 2.02$
	Corte 9	$\sigma_0 = 2.1$
	Corte 10	$\sigma_0 = 2.73$
Caso B	Corte 8	$\sigma_0 = 2.19$
	Corte 9	$\sigma_0 = 1.78$
	Corte 10	$\sigma_0 = 2.08$

Tabela 4.10: CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso A, nos cortes em estudo

	Corte 8		Corte 9		Corte 10	
	Contraste	CNR	Contraste	CNR	Contraste	CNR
Caso A	25	12.38	52.1	24.81	30	10.99
	45.5	22.52	26.5	12.62	57.7	21.14
	20	9.90	26.5	16.05	15	5.49
			22	10.48	27	9.89
μ_{CNR}		14.9		16.0		11.9

Tabela 4.11: CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso B, nos cortes em estudo

	Corte 8		Corte 9		Corte 10	
	Contraste	CNR	Contraste	CNR	Contraste	CNR
Caso B	71	32.4	72	40.4	94.2	45.3
	75.3	34.4	36.4	20.4	54.5	26.2
	32.9	15.0	21.9	12.3	69	33.2
	46.7	21.3	32.5	18.3	44.3	21.3
	59	26.9	37.3	21.0	32.1	15.4
	53.8	24.6	48	27.0	17.8	8.6
	31	14.2	20.4	11.5	61	29.3
	87.4	39.9	33	18.5	38.7	18.6
	45.9	21.0	22.6	12.7	47.8	23.0
	50.2	22.9	43.8	24.6	59.5	28.6
	49.7	22.7	33.2	18.7	18.4	8.8
	46.9	21.4	34.3	19.3		
μ_{CNR}		24.7		18.7		23.5

A razão contraste-ruído, assim como o contraste, é um parâmetro que permite avaliar a qualidade de uma imagem. Assim sendo, quanto maior for este valor, melhor será a qualidade da imagem.

Face à representação gráfica 4.16, foi no caso B que se verificou maior CNR, pelo que se concluiu que, tendo em conta este parâmetro, a qualidade das imagens obtidas no caso B é superior à qualidade obtida no caso A, vindo mais uma vez de acordo com o esperado para melhoria da qualidade da imagem no diz respeito ao contraste, com administração do potencial AC em estudo.

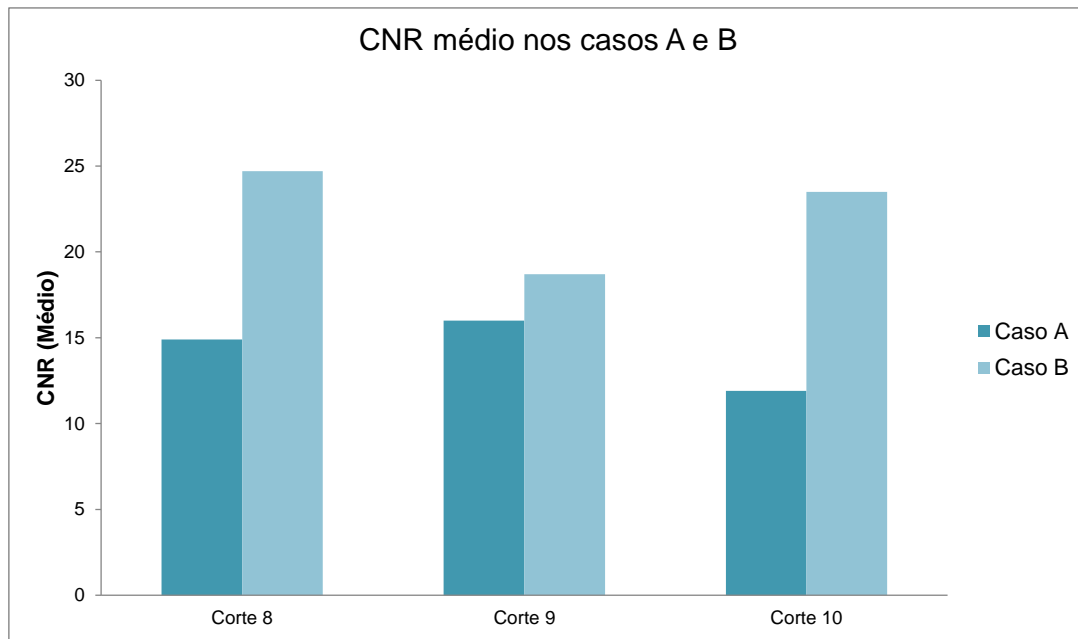


Figura 4.16: Representação gráfica do CNR médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo

Quanto mais intenso for o sinal de RM, melhor será a qualidade de uma imagem. Em geral, devido à baixa intensidade que por vezes se verifica no sinal obtido por RM, este é frequentemente influenciado pelo sinal de fundo. Um fator que quantifica este efeito é a razão sinal-ruído (SNR). Esta razão é influenciada por diversos fatores, como o caso da intensidade do campo aplicado. Devido ao facto de a excitação de volumes maiores produzir sinais de RM mais intensos e o nível de ruído ser determinado pelo scanner, verificam-se melhorias na SNR quando se aplica os métodos de excitação em todo o volume em estudo. Por outro lado, enquanto o tamanho do volume de resolução aumenta relativamente ao tamanho do objeto em estudo, a perda de coerência de fase reduz o contraste na imagem final. Deste modo, quando a imagem de um pequeno objeto é obtida com um grande volume de resolução, apesar de a razão sinal-ruído aumentar para o instrumento, a perda de coerência de fase leva à redução do contraste na imagem final [2].

O objetivo em imagens médicas é a obtenção de uma melhor razão sinal-ruído, combinada com o melhor contraste passível de obtenção no menor intervalo possível. Em IRM, se a SNR não for suficientemente elevada torna-se impossível a distinção de um tecido com o outro, ou com o fundo da imagem. Um dos objetivos principais em IRM é a obtenção de sinal de cada voxel suficientemente elevado em relação ao ruído.

É possível estimar-se a SNR através do rácio entre o valor médio do sinal numa região de interesse e o valor de σ_0 , ou seja, a estimativa da razão sinal-ruído pode obter-se através de:

$$SNR = \frac{S_{região\ de\ interesse}}{\sigma_0} \quad (4.5)$$

O valor de σ_0 corresponde ao valor do desvio padrão numa região de interesse fora do objecto em estudo, onde não haja sinal [36].

Assim, para cada valor de intensidade obtido e já apresentado anteriormente, dividiu-se o valor de σ_0 , também já apresentado, obtendo-se os seguintes valores médios para a SNR de cada corte:

Tabela 4.12: SNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo

	Corte	SNR(média)
Caso A	6	46.97
	7	50.29
	8	47.45
Caso B	6	37.22
	7	46.84
	8	53.83

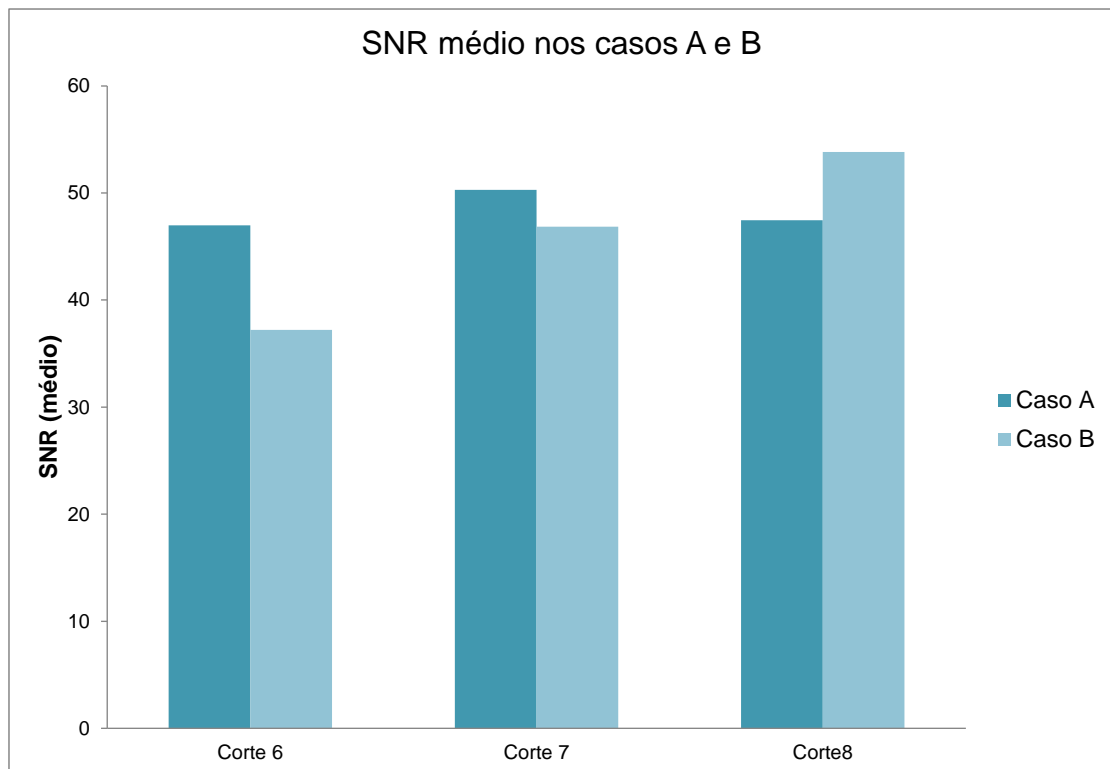


Figura 4.17: Representação gráfica do SNR médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos A e B, nos cortes em estudo

Este parâmetro revelou-se maior no caso em estudo A, relativamente ao corte 8 e 9. Se este parâmetro não for suficientemente elevado, a distinção de um tecido com o outro ou com o fundo da imagem poderá ser difícil, no entanto, em ambos os casos este parâmetro apresentou-se elevado.

4.2.1.2 Comparação com os casos C e D

Após a análise dos casos A e B, e por forma a trabalhar uma amostra estatística mais representativa, efetuou-se um estudo semelhante para os casos C e D. Tal como nos casos anteriores foram obtidas imagens de cortes axiais e com a mesma resolução das anteriores.

As imagens obtidas no caso C, para os cortes 8, 9 e 10 encontram-se apresentadas nas figuras 4.18, 4.19 e 4.20, respetivamente.

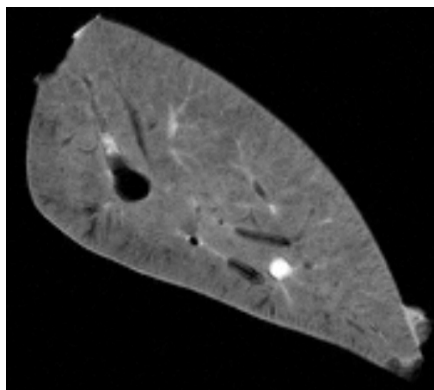


Figura 4.18: Imagem obtida por IRM para o caso C, corte 8

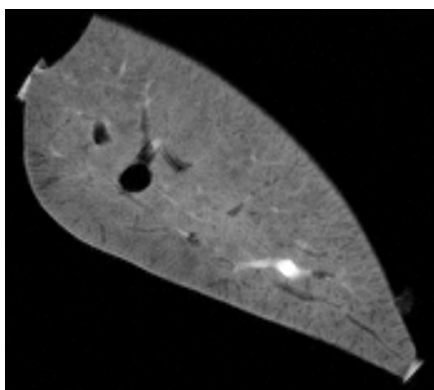


Figura 4.19: Imagem obtida por IRM para o caso C, corte 9

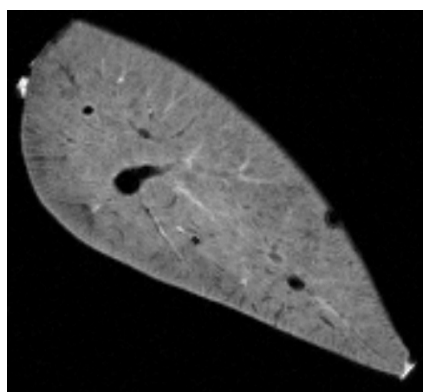


Figura 4.20: Imagem obtida por IRM para o caso C, corte 10

Relativamente ao caso D, as imagens obtidas por IRM encontram-se apresentadas nas figuras 4.21, 4.22 e 4.23.

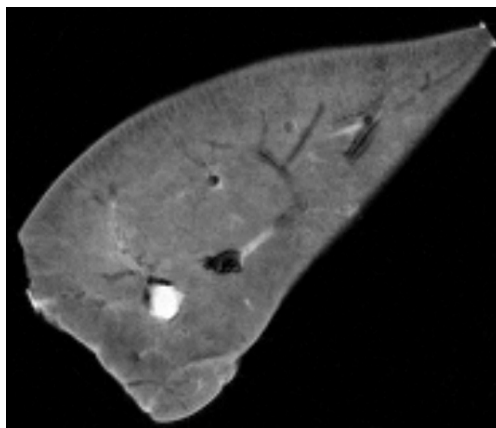


Figura 4.21: Imagem obtida por IRM para o caso D, corte 8

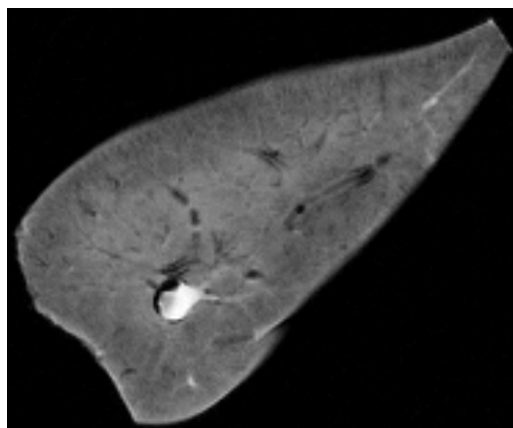


Figura 4.22: Imagem obtida por IRM para o caso D, corte 9

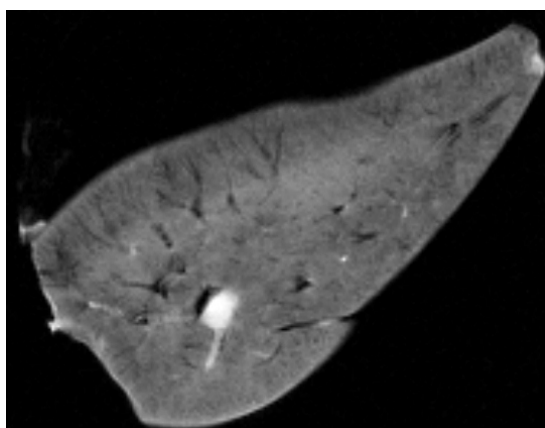


Figura 4.23: Imagem obtida por IRM para o caso D, corte 10

Inicialmente o volume administrado no caso C e D foi o dobro do administrado nos casos anteriores, mas através de análises aos parâmetros bioquímicos efetuados sobre a

coordenação da Dra. Maria Luísa Corvo, chegou-se à conclusão de que a quantidade de ML's C que atingiu o órgão foi aproximadamente igual em todos os casos.

Mais uma vez analisou-se o número de zonas distintas visíveis, obtendo-se os seguintes resultados (tabela 4.13), para os cortes em estudo.

Tabela 4.13: Número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos C e D, nos cortes em estudo

Caso	Corte	Nº Zonas distintas
Caso C	6	14
	7	10
	8	14
Caso D	6	12
	7	12
	8	16

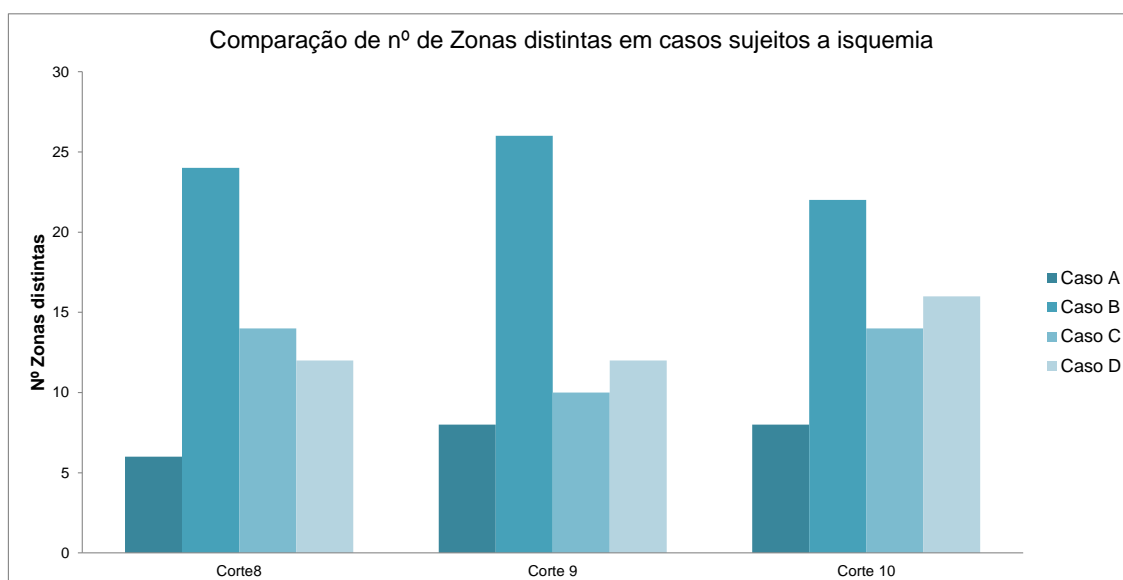


Figura 4.24: Comparação do nº de Zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática

Comparando com os casos anteriormente estudados, verificou-se que nos casos sujeitos a isquemia hepática, com administração de ML's C o número de zonas distintas visíveis nas imagens é maior do que no caso sem a sua administração (caso A). No entanto, este número é maior no caso B tal como se pode verificar através da representação gráfica apresentada na figura 4.24, em que se comparam todos os casos sujeitos a isquemia hepática. Esta diferença poderá ser devida à rapidez de recuperação após a inflamação - visto tratarem-se de órgãos provenientes de animais diferentes, cada um poderá recuperar a uma taxa diferente, vendo-se assim um dano diferente, ainda que com características semelhantes, em cada um dos órgãos.

Relativamente ao contraste, foi efetuado um estudo semelhante ao efetuado para os casos anteriores, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 4.14: Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso C, nos cortes em estudo

	Corte 8			Corte 9			Corte 10		
	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste
Caso C	111	72.2	38.8	129	98.2	30.8	119	33.8	85.2
	110	31.5	78.5	125	58.3	66.7	154	117	37
	112	15.7	96.3	114	60.6	53.4	145	114	31
	137	118	19	147	128	19	168	132	36
	126	102	24	122	100	22	143	111	32
	145	112	33				133	91	42
	123	87	36				174	130	44
$\mu_{contraste}$			46.5			38.4			43.9

Tabela 4.15: Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso D, nos cortes em estudo

	Corte 8			Corte 9			Corte 10		
	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste
Caso D	112	44.4	67.6	124	53.3	70.7	94.6	46.5	48.1
	105	58.5	46.5	97.9	39.3	58.6	116	41.4	74.6
	124	91.9	32.1	101.9	76.1	25.8	113	51.8	61.2
	110	86.4	23.6	106	51.9	54.1	125	63.4	61.6
	108	72	36	112	86.8	25.2	127	73.6	53.4
	112	97.1	14.9	111	76.5	35.5	108	81.1	26.9
							113	85	28
							112	60.2	51.8
$\mu_{contraste}$			36.8			45.0			50.7

Mais uma vez, comparando com os casos anteriores, verificou-se que o valor médio do contraste entre regiões adjacentes é maior nos casos com administração de magnetolipossomas, B, C e D, no entanto mais uma vez e relativamente aos cortes 8 e 10, é no caso B que se verifica mais contraste, enquanto que no corte 9, é no caso D que isto se verifica, tal como se pode comprovar pela representação gráfica apresentada na figura 4.25.

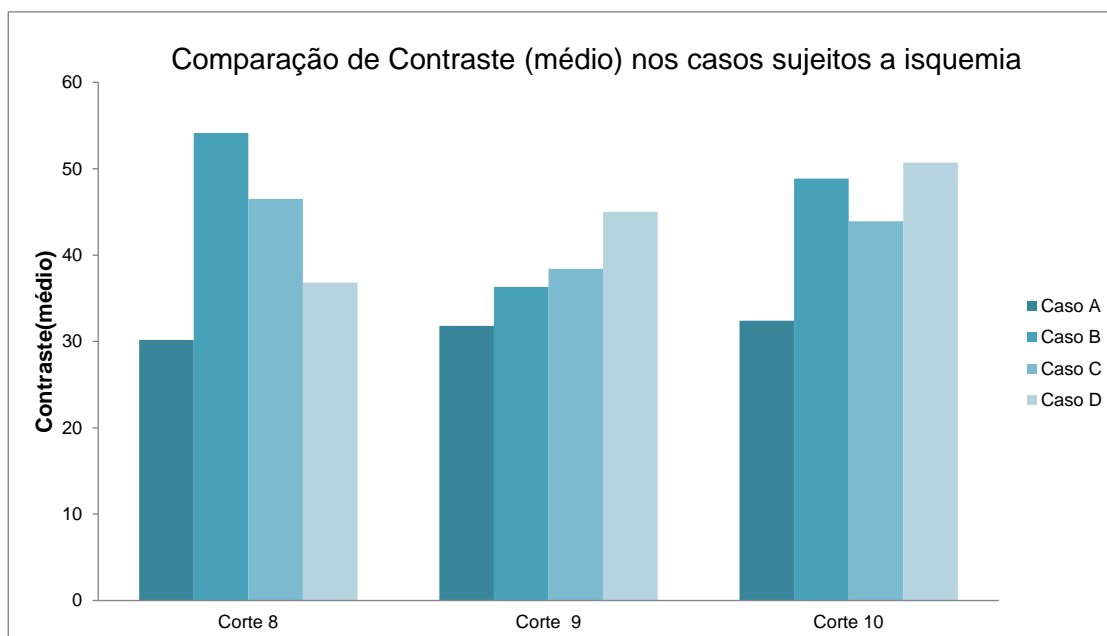


Figura 4.25: Comparação do Contraste médio entre zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática

Tal como anteriormente, quantificou-se a razão contraste-ruído, de forma idêntica à análise dos casos anteriores, tendo-se obtido os seguintes valores:

Tabela 4.16: Valores de σ_0 nos casos C e D, nos cortes em estudo

Caso C	Corte 8	$\sigma_0 = 2.19$
	Corte 9	$\sigma_0 = 2.22$
	Corte 10	$\sigma_0 = 2.18$
Caso D	Corte 8	$\sigma_0 = 2.01$
	Corte 9	$\sigma_0 = 2.03$
	Corte 10	$\sigma_0 = 2.12$

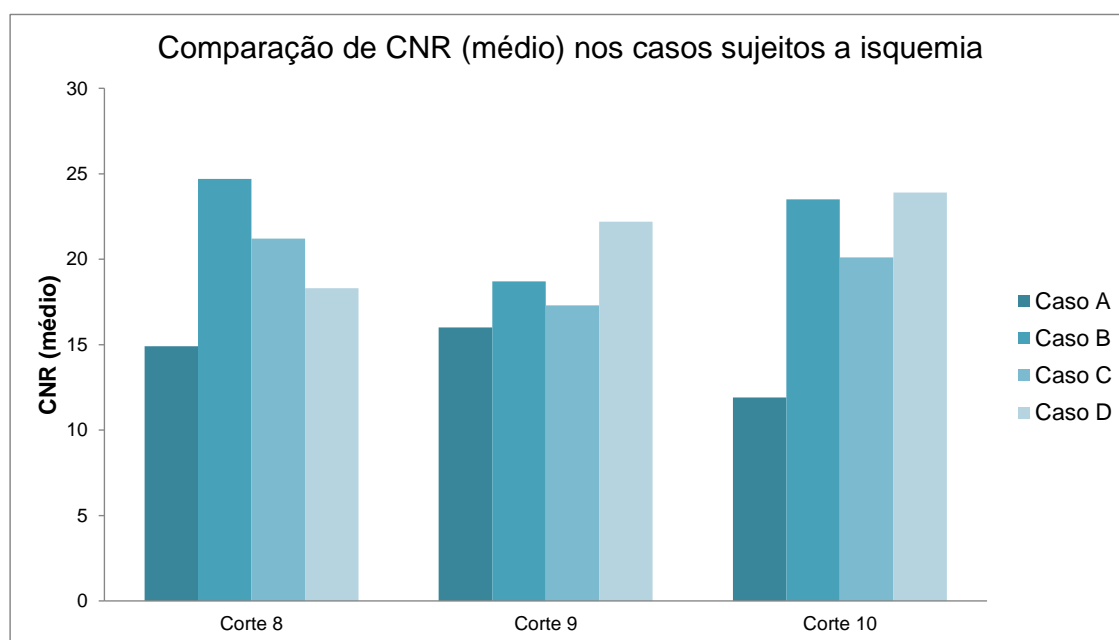
Tabela 4.17: CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso C, nos cortes em estudo

	Corte 8		Corte 9		Corte 10	
	Contraste	CNR	Contraste	CNR	Contraste	CNR
Caso C	38.8	17.72	30.8	13.87	85.2	39.08
	78.5	35.84	66.7	30.05	37	16.97
	96.3	43.97	53.4	24.05	31	14.22
	19	8.68	19	8.56	36	16.51
	24	10.96	22	9.91	32	14.68
	33	15.07			42	19.27
	36	16.44			44	20.18
μ_{CNR}		21.2		17.3		20.1

Tabela 4.18: CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso D, nos cortes em estudo

	Corte 8		Corte 9		Corte 10	
	Contraste	CNR	Contraste	CNR	Contraste	CNR
Caso D	67.6	33.63	70.7	34.83	48.1	22.69
	46.5	23.13	58.6	28.87	74.6	35.19
	32.1	15.97	25.8	12.71	61.2	28.87
	23.6	11.74	54.1	26.65	61.6	29.06
	36	17.91	25.2	12.41	53.4	25.19
	14.9	7.41	35.5	17.49	26.9	12.69
					28	13.21
					51.8	23.43
μ_{CNR}		18.3		22.2		23.9

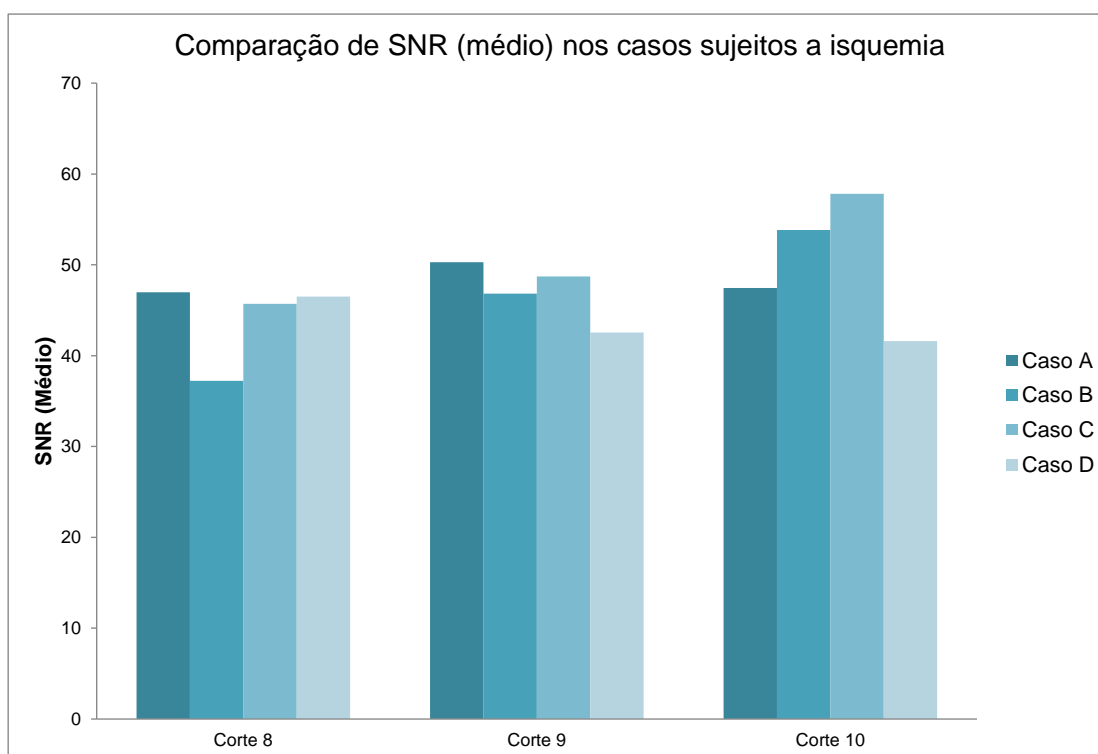
Tal como o contraste, a razão contraste-ruído apresenta valores mais elevados nos casos com administração de magnetolipossomas (como se pode constatar através da representação gráfica na figura 4.26).

**Figura 4.26:** Comparação de CNR médio, para as ROI selecionadas, nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática

Quanto à razão sinal-ruído, esta apresenta os valores apresentados na tabela 4.19. Verificou-se que em todos os casos em estudo apresenta valores elevados, tal como se pode constatar pela representação gráfica da figura 4.27.

Tabela 4.19: SNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas nos casos C e D, nos cortes em estudo

	Corte	SNR(média)
Caso C	6	45.71
	7	48.74
	8	57.82
Caso D	6	46.52
	7	42.56
	8	41.62

**Figura 4.27:** Comparação de SNR médio, para as ROI selecionadas, nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os casos em estudo sujeitos a isquemia hepática

4.2.1.3 Determinação de T2 por Eco de Spin múltiplo com 8 ecos

Procedendo como descrito no capítulo 2, obtiveram-se os tempos de relaxação T2 por IRM para os casos em estudo. Os valores obtidos encontram-se na tabela 4.20.

Verificou-se que no caso com administração de ML's C e sujeitos a isquemia hepática, o valor de T2 é inferior ao obtido sem administração de ML's C, demonstrando que estes actuam na diminuição da constante de relaxação transversal em casos de órgãos sujeitos a isquemia hepática.

Tabela 4.20: Valor obtido para T2 por imagem para os casos em estudo

	T2(ms)
Caso A	14.8
Caso B	12.3
Caso C	13.14
Caso D	12.44

4.2.1.4 Potencial utilização como Agente de Contraste em caso de isquemia hepática

Em imagens obtidas através de sequências rápidas, o número de acumulações, pontos da matriz, e TR devem ser curtos, pelo que se espera que nestes casos a resolução espacial e a razão contraste-ruído sejam piores. No entanto, é importante ter em consideração que para um bom diagnóstico clínico o mais importante não será a "beleza" da imagem mas sim a sua qualidade, ou seja, a maximização do número de estruturas diferentes visíveis [10]. A melhor qualidade de imagem, contraste e distinção de estruturas verificou-se com a utilização da sequência FLASH (sequência rápida) face à sequência Eco de Spin. Motivo pelo qual as imagens consideradas na realização do presente trabalho foram as obtidas através da sequência FLASH. Relativamente ao TE, foi efetuado um estudo por forma a averiguar com qual TE se verificou a presença de maior definição e mais número de estruturas.

Obtidas as imagens, e efetuado o estudo acerca da qualidade das imagens obtidas, e face aos valores obtidos, ficou comprovado que em todos os casos estudados a razão sinal-ruído apresentou valores suficientemente elevados por forma a permitir a distinção dos diferentes tecidos.

No caso B, C e D foram visíveis mais zonas distintas e detalhe nas imagens obtidas, em comparação ao caso A, no entanto foi no caso B que esta diferença se tornou mais evidente. Foi ainda quantificado o contraste e a razão contraste-ruído, comprovando-se que nos casos em que houve administração de magnetolipossomas, estes parâmetros foram superiores comprovando o seu potencial para utilização como AC's em IRM, no caso de isquemia hepática.

Esperava-se que as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro diminuíssem a intensidade do sinal nos tecidos normais do órgão, não alterando a sua intensidade nos tecidos sujeitos a inflamação. Face às imagens obtidas, foram observadas mais estruturas e com melhor contraste nos casos em que houve administração de ML's C, face ao caso A, podendo-se concluir que houve acumulação destes no órgão, podendo ser classificados como agentes para especificação para órgãos, neste caso o fígado. A melhoria no contraste terá então sido devida à alteração na intensidade do sinal nos tecidos normais face aos isquêmicos. No entanto, é importante ter em conta que não foram estudados os efeitos dos procedimentos cirúrgicos invasivos, pelo que não se sabe exatamente qual o dano causado pela isquemia e se as estruturas visíveis poderão ser consequência ou

não destes procedimentos. Na realidade, a isquemia induzida pode não ter resultado em consequências iguais nos diferentes casos e estes poderão ter recuperado de forma diferente nas 24h que a sucederam. O fator tempo foi importante - tanto o tempo desde a indução da isquemia até à sua morte, como o tempo de duração da indução da isquemia. Quanto maior fosse o tempo de indução isquêmica, maior seria o dano provocado. Por outro lado, devido ao facto de o órgão ter capacidade de recuperação deste tipo de inflamação, o inverso aconteceria com o tempo de espera desde a indução da mesma até à morte do animal, verificando-se menos dano quanto maior fosse o tempo para se dar esta recuperação.

Relativamente aos valores de T2 obtidos por IRM, estes apresentaram-se inferiores nos casos com administração de ML's C face ao caso de estudo sem utilização dos mesmos. No entanto, este valor apresentou um valor superior no caso em estudo C, face ao B e D, o que vem de acordo com os valores obtidos para os restantes parâmetros quantificados em que se constatou um valor de contraste médio superior e CNR, em dois dos cortes em estudo, para os casos B e D, face ao caso C.

As imagens com maior contraste e maior número de estruturas visíveis foram obtidas no caso B, em que o volume de nanopartículas administradas foi metade do volume dos casos C e D, no entanto, é necessário em trabalhos futuros determinar qual o volume ideal por forma a aumentar o potencial como AC. Outro fator importante é a concentração interna de ferro, que permite um melhor contraste [21], pelo que é também importante dosear o ferro nos ML's C.

4.2.2 Estudo de caso em órgão normal, por IRM

Por forma a compreender os efeitos da isquemia na anatomia normal do fígado e da utilização de ML's C, estudou-se o caso E, não sujeito a isquemia hepática mas com administração intravenosa de ML's C.

As imagens foram obtidas com a mesma resolução dos casos anteriores, sendo analisados novamente os cortes 8, 9 e 10, obtendo-se, respetivamente, para o caso E, as imagens correspondentes às figuras 4.28, 4.29 e 4.30.

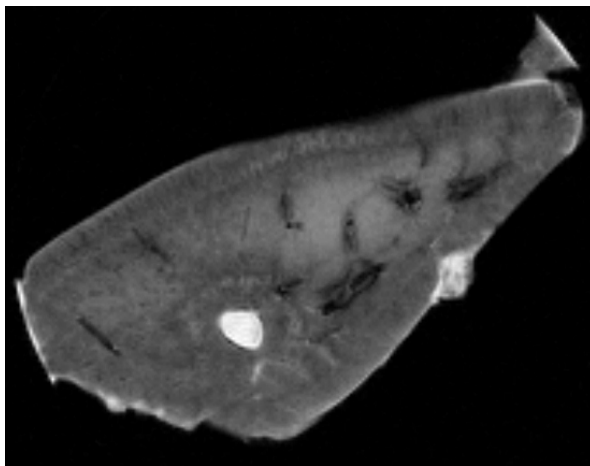


Figura 4.28: Imagem obtida por IRM para o caso E, corte 8

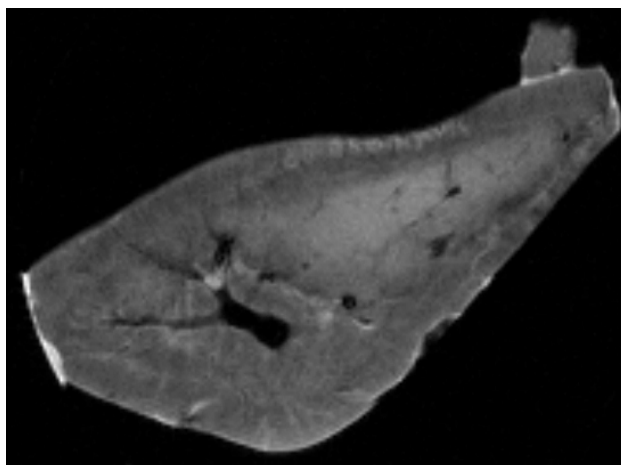


Figura 4.29: Imagem obtida por IRM para o caso E, corte 9

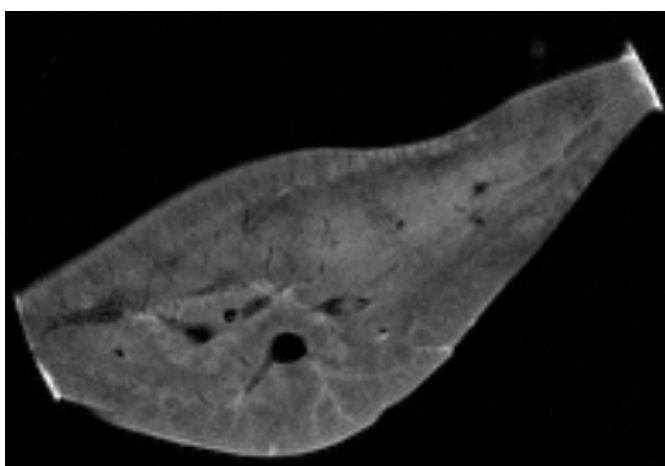


Figura 4.30: Imagem obtida por IRM para o caso E, corte 10

As imagens obtidas apresentam pouca heterogeneidade, não sendo visível a distinção de grande número de estruturas ou contraste entre estas ao nível periférico como nos

casos anteriores com administração de ML's C.

4.2.2.1 Avaliação da qualidade das imagens

Tal como nos casos anteriormente estudados realizou-se a análise da qualidade das imagens obtidas. Seleccionadas regiões de interesse, apresentadas em anexo A, quantificou-se o número de zonas distintas em 3 cortes diferentes (apresentado na tabela 4.21).

Tabela 4.21: Número de zonas distintas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo

Caso	Corte	Nº Zonas distintas
Caso E	6	8
	7	8
	8	10

O interesse do estudo deste caso é o da comparação com os casos anteriores, tentando compreender o efeito da isquemia hepática e da administração dos ML's C. Relativamente a este primeiro parâmetro, a sua comparação é visível pela representação gráfica apresentada na figura 4.31.

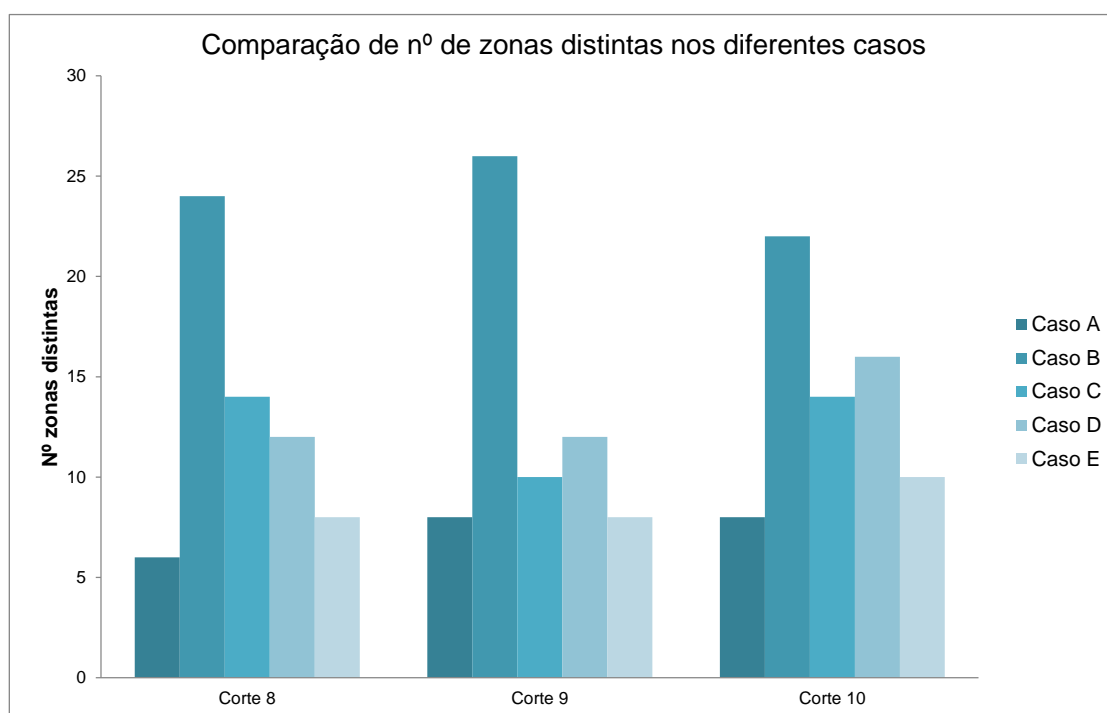


Figura 4.31: Comparação do nº de Zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para todos os casos em estudo

Verificou-se a existência de menor número de zonas distintas no caso E, ou seja, no fígado normal, sem isquemia hepática mas com administração de ML's C, face aos casos

do órgão sujeito a isquemia e com administração de ML's C.

Procedeu-se como anteriormente para quantificar o contraste. O resultado encontra-se apresentado na tabela 4.22.

Tabela 4.22: Contraste entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo

	Corte 8			Corte 9			Corte 10		
	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste	μ_+	μ_-	Contraste
Caso F	112	54.4	57.6	80.6	23.1	57.5	88.5	34.5	54
	110	88.3	21.7	94.5	61	33.5	103	57.8	45.2
	92.6	80.5	12.1	116	99.3	16.7	98.1	80.2	17.9
	92.9	59.4	33.5	108	88.5	19.5	95.3	75.6	19.7
							108	90.5	17.5
$\mu_{contraste}$			31.2			31.8			30.9

O contraste é maior nos casos sujeitos a isquemia hepática e com administração de ML's C. Comparando os casos A e E, o valor do contraste apresenta resultados semelhantes.

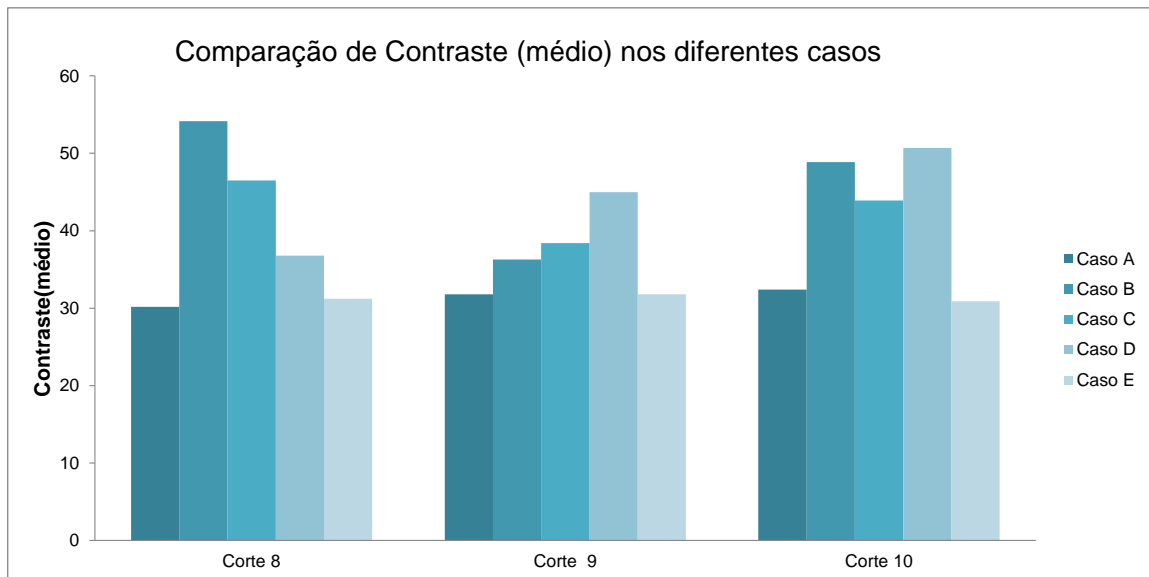


Figura 4.32: Comparação do Contraste médio entre zonas distintas visíveis nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os todos os casos em estudo

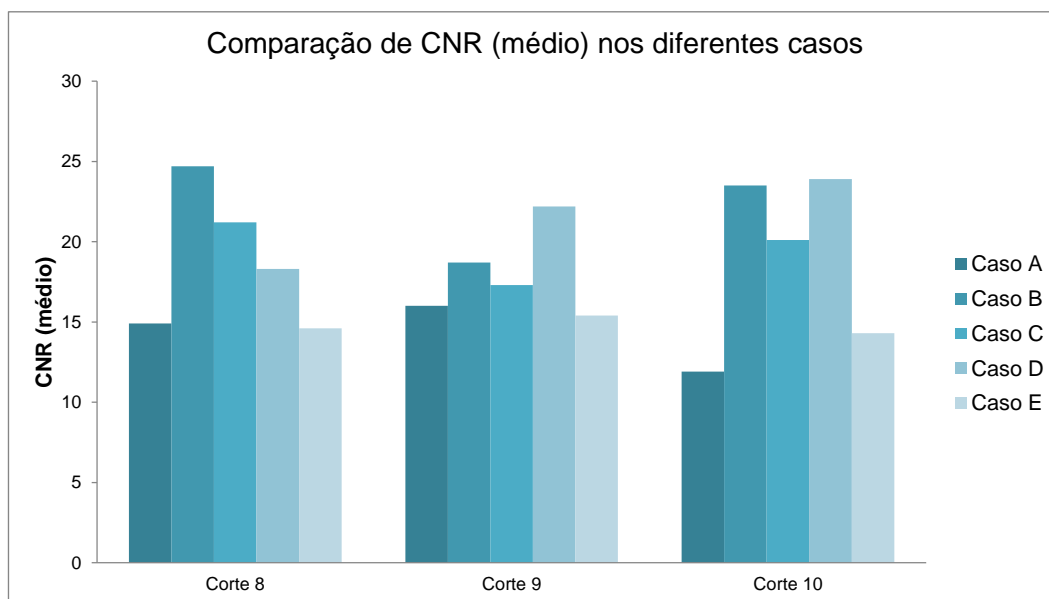
Mais uma vez, após obtenção do desvio padrão de uma zona sem sinal, fora do objeto em estudo, analisou-se a razão contraste-ruído, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 4.23: Valores de σ_0 no caso E, nos cortes em estudo

Caso E	Corte 8	$\sigma_0 = 2.14$
	Corte 9	$\sigma_0 = 2.07$
	Corte 10	$\sigma_0 = 2.16$

Tabela 4.24: CNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo

	Corte 8		Corte 9		Corte 10	
	Contraste	CNR	Contraste	CNR	Contraste	CNR
Caso F	57.6	26.92	57.5	32.61	54	25
	21.7	10.14	33.5	16.18	45.2	20.93
	12.1	5.65	16.7	8.07	17.9	8.29
	33.5	15.65	19.5	9.42	19.7	9.12
					17.5	8.10
μ_{CNR}		14.6		15.4		14.3

**Figura 4.33:** Representação gráfica do CNR médio entre zonas distintas, dentro da ROI, nos diferentes casos em estudo

A CNR apresenta valores superiores nos casos sujeitos a isquemia hepática e com administração de ML's C, tal como os parâmetros anteriormente estudados.

Relativamente à razão sinal-ruído, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 4.25.

Tabela 4.25: SNR entre as diferentes zonas visíveis, dentro da ROI, nas imagens obtidas no caso E, nos cortes em estudo

	Corte	SNR(média)
Caso F	6	40.3
	7	40.52
	8	38.5

A SNR apresentou valores inferiores no caso E, face aos restantes casos, em todos os cortes em estudo.

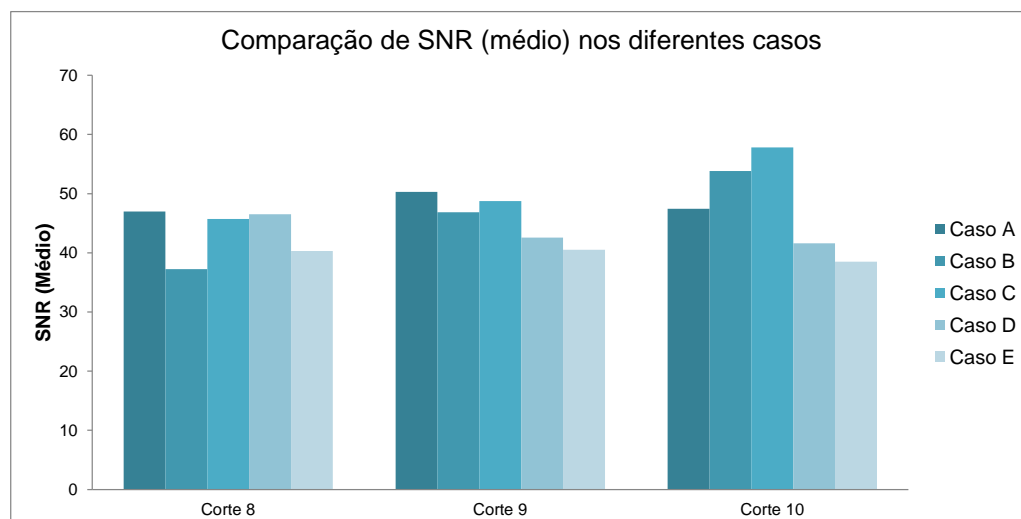


Figura 4.34: Comparação de SNR médio, para as ROI selecionadas, nas imagens obtidas, nos diferentes cortes, para os diferentes casos em estudo

4.2.2.2 Potencial utilização como Agente de Contraste em casos de órgãos normais

Não se verificou maior distinção de estruturas ou melhoria no contraste no caso E face aos restantes casos com administração de ML's C e sujeitos a isquemia hepática, não havendo alargamento das vasos nas zonas mais periféricas. O animal estudado no caso E não foi sujeito a isquemia hepática, pelo que as estruturas visíveis na imagem corresponderão a uma anatomia conservada e a uma periferia pouco danificada.

Face a estes resultados, é possível a conclusão de que no caso de um fígado normal, sem dano, as nanopartículas ML's C não melhoram o contraste em IRM. Estes resultados também são influenciados pelo volume de ML's C administrado, que poderá não estar no volume ideal por forma a se obterem resultados satisfatórios ao nível da sua utilização como potencial AC. No entanto, um estudo mais detalhado, por exemplo ao nível dos parâmetros bioquímicos, seria útil para uma compreensão mais clara destes resultados, e qual o papel e local de deposição dos magnetolipossomas, no caso de um fígado normal, sem isquemia hepática.

Tal como anteriormente, é importante referir que não foi efetuado um estudo ao nível dos efeitos dos procedimentos cirúrgicos para a administração dos magnetolipossomas, que poderão ter influenciado os resultados obtidos.



Conclusões e Perspectivas Futuras

O tema da presente dissertação, *Estudo da potencial utilização como agente de contraste em Imagem por Ressonância Magnética de novos magnetolipossomas*, insere-se na área dos Biomateriais e Imagem Médica. Esta teve como objetivos principais, numa primeira parte o estudo da eficiência de magnetolipossomas - ML SPC:Chol - desenvolvidos, a serem utilizados como potenciais agentes de contraste, ou seja, o estudo da sua relaxividade, e numa segunda parte, a obtenção de imagens de IRM e o seu estudo e quantificação da qualidade das imagens obtidas após administração de um potencial AC desenvolvido - o ML C.

Para a primeira parte do trabalho foi inicialmente sintetizado um ferrofluido constituído por nanopartículas de magnetite no Instituto Superior Técnico, e em seguida desenvolveu-se na Unidade de "Novas Formas de Agentes Bioactivos", da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, magnetolipossomas constituídos por um núcleo central de magnetite (com o ferrofluido sintetizado), revestido por um surfactante, e envoltos por fosfatidicolina de soja, com diferentes formulações ao nível da quantidade de colesterol na sua bicamada fosfolipídica - os ML's SPC:Chol. Estudou-se a sua relaxividade, através do *Espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHZ Avance III*, existente no CENIMAT/i3N, tendo-se obtido valores muito reduzidos para a relaxividade longitudinal das diferentes formulações desenvolvidas. Relativamente à relaxividade transversal, a formulação que não continha colesterol foi a que apresentou um maior valor de r_2 , seguida da formulação com razão molar de SPC:Chol 1:0,5 e por fim a formulação SPC:Chol 1:1. Foi efetuado o estudo por imagem de RM, no mesmo equipamento, obtendo-se valores concordantes com os obtidos por Espectroscopia. Estes valores permitiram a conclusão de que os magnetolipossomas desenvolvidos apresentavam potencial para serem utilizados como AC's negativos, diminuindo o valor do tempo

de relaxação T2. As formulações desenvolvidas diferenciaram-se entre si pelo colesterol presente na bicamada, sendo que na sua presença a membrana diminui a sua permeabilidade devido ao facto de se tornar mais rígida, condicionando a troca de água entre o interior e o exterior, diminuindo a eficiência dos magnetolipossomas como potenciais AC's negativos em IRM, o que se comprovou pelos valores obtidos para a relaxividade. Estudos do comportamento do colesterol na eficiência como AC's de compostos desenvolvidos apenas tinham sido estudados para AC's positivos com compostos de gadolínio [41, 42, 43], mas apresentaram resultados concordantes com os obtidos na presente dissertação. Este estudo foi importante pois o colesterol é adicionado em diversas formulações de ML's por forma a se obterem lipossomas com maior estabilidade para administração intravenosa [50].

Na segunda parte do trabalho estudou-se o comportamento de magnetolipossomas com um longo tempo de circulação na corrente sanguínea (ML's C) em órgãos, nomeadamente fígados de ratos, através de imagens obtidas por RM. Foi investigada a sua potencial utilização como agente de contraste em imagem por ressonância magnética. Estes diferem dos anteriormente estudados pela sua composição – possuem um núcleo central de magnetite envolto por PEG, que se encontra encapsulado por uma bicamada de fosfatidicolina de ovo que possui uma ligação a um polímero de PEG. O PEG foi utilizado por forma a aumentar o tempo de circulação no sangue destas nanopartículas.

O estudo foi efetuado no mesmo equipamento de RM já referido anteriormente, utilizando-se para a obtenção das imagens, uma sequência de impulsos rápida de Eco de Gradiente – a sequência FLASH.

Foram estudados órgãos sujeitos a isquemia hepática, através de uma lesão controlada, tentando recriar o dano mínimo existente num transplante hepático, e em seguida a aplicação de magnetolipossomas em três casos em estudo, comparando com um caso apenas sujeito a isquemia hepática. A nível do dano celular no fígado, este pode ser causado durante a isquemia, mas também na reperfusão que se segue, resultando em disfunção local e sistémica do órgão. As alterações bioquímicas causadas pelo dano da isquemia hepática, podem conduzir a remodelações hepatocelulares, incluindo remodelação celular ou morte celular programada irreversível. Diagnósticos precoces são fundamentais para intervenções terapêuticas suficientes, impedindo a sua progressão na insuficiência hepática [48]. Assim, é importante a identificação e compreensão deste tipo de lesões, sendo a IRM uma ferramenta útil para esta análise. Em seguida estudou-se o efeito da utilização dos magnetolipossomas num órgão normal, não sujeito a isquemia hepática, mas com administração de ML's C.

Comparando os casos sujeitos a isquemia, concluiu-se que com a utilização de magnetolipossomas, foi possível a visualização de mais estruturas, com maior detalhe, maior contraste e maior razão contraste-ruído, apresentando ainda uma razão sinal-ruído suficientemente elevada por forma a permitir a discriminação das diferentes estruturas presentes na imagem, comparativamente a um órgão apenas sujeito a isquemia hepática,

sem administração de magnetolipossomas. Estes parâmetros foram quantificados através da seleção de uma região de interesse dentro do órgão e obtenção do sinal entre zonas distintas adjacentes.

Para o órgão normal, a utilização de ML's C não permitiu a melhoria do contraste, nem a visualização de mais estruturas presentes no órgão, não sendo visível tanta definição na sua periferia em relação aos restantes casos.

Os ML's utilizados, além de poderem ser classificados como agentes de contraste negativo, revelaram, ao nível da sua biodistribuição, serem agentes de especificação para o fígado, verificando-se a sua acumulação neste órgão após as 24h que precederam a sua administração intravenosa. A vascularização evidenciada nas imagens obtidas para os casos sujeitos a isquemia hepática apresentou maior homogeneidade no caso sem administração de ML's, enquanto que nos casos com a sua administração verificou-se maior vascularização, principalmente na periferia do órgão, evidenciando o dano provocado pela isquemia hepática. Esta evidência foi visível através da utilização dos ML's C, revelando a sua potencialidade como AC em IRM. A sua classificação como AC's negativos provém da diminuição do tempo de relaxação T2 e T2* dos tecidos. No entanto, esta utilização apenas se demonstrou eficaz no caso de isquemia hepática, comprovando-se que estas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro diminuíram a intensidade do sinal nos tecidos normais do órgão, não alterando a sua intensidade nos tecidos sujeitos a inflamação, aumentando o contraste entre as diferentes zonas, o que seria de esperar e que já se encontrava referido na literatura [12]. Obtiveram-se ainda os valores de T2 através de uma sequência de impulsos *msme*, apresentando-se inferiores nos casos com utilização de ML's e sujeitos a isquemia hepática, demonstrando a sua atuação na diminuição da relaxação transversal quando sujeito a inflamação.

Um possível trabalho futuro poderá ser o estudo dos efeitos dos procedimentos cirúrgicos invasivos, que poderão ter causado algum dano no órgão visível nas imagens obtidas. É importante também ter em conta que poderão existir coágulos, pelo que estes se poderão impor à entrada ou saída de formol, ocupando espaços nos vasos, que o fomblin não foi capaz de ocupar, apresentado assim sinal de RM.

Relativamente aos riscos associados com o uso de magnetolipossomas para aplicações *in vivo*, estes prendem-se com o uso da magnetite. Ao uso de óxidos de ferro está associado um efeito tóxico, podendo surgir inflamação, formação de corpos apoptóticos, surgimento de espécies reativas de oxigénio, condensação cromossómica, entre outros. A toxicidade associada depende de diversos fatores como o tipo de revestimento da superfície ou os seus produtos de degradação, composição química do meio celular, estado de oxidação dos óxidos de ferro utilizados e a interação entre estes e as proteínas. O revestimento utilizado para as nanopartículas é de extrema importância na medida em que este funcionará como uma barreira de proteção face a estes efeitos nocivos, conferindo-lhes estabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, sendo que o seu comportamento químico deve ser estudado de forma a prever a sua interação com as células [51].

Posto isto, outro possível trabalho futuro poderá ser o estudo da toxicidade associada

aos ML's SPC:Chol desenvolvidos na primeira parte do trabalho, e da sua biocompatibilidade.

Em relação aos ML's C estudados na segunda parte do trabalho, e por o estudo ter sido efetuado por forma a reproduzir o dano mínimo que há num transplante hepático, é importante ter em conta o efeito que os óxidos de ferro administrados poderão ter sobre o fígado, nomeadamente a ocorrência de reações de *Haber-Weiss*. Estas ocorrem pela combinação de H_2O_2 (Peróxido de Hidrogénio) com o Fe^{2+} (que pode, devido à utilização de magnetite, surgir pela sua oxidação) surgindo Fe^{3+} , que pode ser novamente reduzido, levando ao aparecimento de radicais hidroxílicos, que se caracterizam por serem muito reativos, iniciando reações oxidativas que podem conduzir a peroxidação de lípidos na membrana, danos em proteínas e pequenas moléculas, e em último caso em morte celular [52]. A nível hepático os efeitos tóxicos do ferro prendem-se com a sua deposição nas células de Kupffer e nos hepatócitos, e é possível que a partir de uma certa concentração de ferro administrado e que chega ao fígado, esta reação ocorra. Porém, um estudo efetuado com magnetolipossomas com formulação não exatamente igual, mas semelhante [21], revelou que estes são altamente estáveis *in vivo* e não tóxicos, pelo que um estudo semelhante poderá no futuro ser efetuado com os magnetolipossomas utilizados na presente dissertação.

Assim sendo, e tendo em conta o fator associado à toxicidade, e com vista também a maximizar o contraste, podendo estes magnetolipossomas, ML's C, vir a ser utilizados como agentes de contraste em IRM, um trabalho futuro a desenvolver poderá ser o estudo da concentração e quantidade ótima a administrar, pois conforme o verificado com este estudo, o contraste melhora mas a dosagem administrada poderá não ser a dosagem ótima.

O estudo apresentado na segunda parte deste trabalho foi efetuado em órgãos de animais sem vida, no entanto, seria interessante num possível trabalho futuro comparar imagens de animais *in vivo*, antes e após a administração dos ML's C. No entanto no presente trabalho tal estudo não foi efetuado devido ao facto de o equipamento existente no CENIMAT/i3N não possuir um sincronizador que permita que o batimento cardíaco do animal não influencie a qualidade das imagens obtidas.

O presente trabalho efetuou-se a um campo magnético de 7 Tesla, enquanto que atualmente os campos utilizados na prática clínica são da ordem dos 3 Tesla. No entanto, a tendência atual em IRM é a utilização de campos magnéticos mais elevados daí também o interesse do trabalho aqui apresentado.

Bibliografia

- [1] Laudadio T. *Subspace-Based Quantification of Magnetic Resonance Spectroscopy using Date Biochemical Prior Knowledge*. Katholieke Universiteit Leuven, Faculteit Toegepaste Wetenschappen, Departement Elektrotechniek, 2005.
- [2] Young S. *Nuclear Magnetic Resonance Imaging: Basic Principles*. Raven Press, 1984.
- [3] Bon Na H. et al. *Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents*. *Advanced Materials*, 21:2133–2148, 2009.
- [4] Pope J. *Medical Physics: Imaging*. Heinemann, 1999.
- [5] Mazzola A.A. *Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional*. *Revista Brasileira de Física Médica*, 3:117–129, 2009.
- [6] Fieremans Els. *Validation Methods for Diffusion Weighted Magnetic Resonance Imaging in Brain White Matter*. Ghent University. Faculty of Engineering, 2008.
- [7] Hore P. J. *NMR Principles*. Academic Press, 1999.
- [8] Brown M. and Semelka R. *MRI Basic Principles and Applications*. John Wiley and Sons, 2003.
- [9] Storey P. *Introduction to Magnetic Resonance Imaging - Methods and Biologic Applications*. Human Press, 2006.
- [10] Rinck P.A. *Magnetic Resonance in Medicine*. Blackwell Science, 2001.
- [11] Merbach A. and Tóth E. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Wiley, 2001.
- [12] Bellin M.F. *MR contrast agents, the old and the new*. *European Journal of Radiology*, 60:314–323.

- [13] Laurent S. et al. *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications*. *Chem. Rev.*, 108:2064–2110, 2008.
- [14] Pisco J.M. *Imagiologia Básica - Texto e Atlas*. Lidel - Edições Técnicas, 2003.
- [15] Pankhurst Q.A. et al. *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36:167–181, 2008.
- [16] Geraldes C. and Laurent S. *Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging*. *Contrast Media Mol. Imaging*, 4:1–23, 2009.
- [17] Muller R. et al. *Particulate Magnetic Contrast Agents*. John Wiley and Sons, Ltd, 2001.
- [18] Gossuin Y. et al. *Magnetic Resonance relaxation properties of superparamagnetic particles*. *WIRE's Nanomed Nanobiotechnology*, 1:299–310, 2009.
- [19] Lu J. et al. *Manganese ferrite nanoparticle micellar nanocomposites as MRI contrast agent for liver imaging*. *Biomaterials*, 30:2919–2928, 2009.
- [20] Bjornerud A. and Johansson L. *The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: theoretical consideration and applications in the cardiovascular system*. *NMR in Biomedicine*, 17:465–477, 2004.
- [21] Martina M.S. et al. *Generation of Superparamagnetic Liposomes Revealed as Highly Efficient MRI Contrast Agents for in Vivo Imaging*. *J. AM. CHEM. SOC.*, 127:10676–10685, 2005.
- [22] Taboada. E. et al. *Relaxometric and Magnetic Characterization of Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles with High Magnetization. Evaluation as Potential T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Molecular Imaging*. *Langmuir*, 23(8):4583–4588, 2007.
- [23] Brisset J.C. et al. *Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7T and 7T*. *Experimental*, 20:275–285, 2010.
- [24] Klug G. et al. *Intracellular and Extracellular T1 and T2 Relaxivities of Magneto-Optical Nanoparticles at Experimental High Fields*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 64:1607–1615, 2010.
- [25] Bulte J. et al. *Magnetoliposomes as Contrast Agents*. *Methods in Enzymology*, 373:175–198, 2003.
- [26] Cintra E.R. et al. *Nanoparticle agglomerates in magnetoliposomes*. *Nanotechnology*, 20:1–6, 2009.
- [27] Ferreira F. et al. *Estudo da encapsulação de partículas magnéticas dentro de lipossomas unilamelares*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 4:40–43, 2007.

- [28] Coelho J.P. *Avaliação da biocompatibilidade de Magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita*. Pós-graduação em patologia molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2008.
- [29] Soenen S. J. et al. *Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents. Advanced Review*, 3:197–211, 2011.
- [30] Crommelin D. et al. *Liposomes - Successful Carrier Systems for Targeted Delivery of Drugs*. Business Briefing : Pharmatech, 2003.
- [31] Batista C. M. et al. *Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2):167–179, 2007.
- [32] Fagefors J. et al. *Adsorption from soybean phosphatidylcholine/ N-dodecyl β -D-maltoside dispersions at liquid/solid and liquid/air interfaces*. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 116:100–106, 2000.
- [33] Faria M.R. *Development and Characterization of Magnetoliposomes for Drug Delivery Applications*. Master's degree dissertation in biomedical engineering, IST-UTL, 2011.
- [34] Maeng J.H. et al. *Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer*. *Biomaterials*, 31:4995–5006, 2010.
- [35] Hendee W. R. and Ritenour E.R. *Medical Imaging Physics-Fourth Edition*. Wiley-Liss, Inc, 2002.
- [36] Slichter C.P. *Principles of Magnetic Resonance*. Springer-Verlag, 1978.
- [37] Haacke M. et al. *Magnetic Resonance Imaging – Physical Principles and Sequence Design*. Wiley-Liss, Inc., 1999.
- [38] Claridge T. D.W. *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Elsevier, 2000.
- [39] Martins P. and Neuhaus P. *Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat*. *Liver International*, pages 384–392.
- [40] Hornak J. *The Basics of MRI*. Available from: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/index.html>.
- [41] Strijkers G.J. et al. *Relaxivity of liposomal paramagnetic MRI contrast agents*. *Research Article*, 18:186–192, 2005.
- [42] Tilsock C. et al. *Liposomal Gd-DTPA: Preparation and Characterization of Relaxivity*. *Radiology*, 171:77–80, 1989.
- [43] Ghaghada K. et al. *T1 relaxivity of Core-encapsulated Gadolinium Liposomal Contrast Agents – Effect of liposome Size and Internal Gadolinium Concentration*. *Academic Radiology*, 15:1259–1263, 2008.

- [44] Mulder W. et al. *Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging*. *NMR in Biomedicine*, 19:142–164, 2006.
- [45] Simon G.H. et al. *T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning*. *European Journal of Radiology*, 16:738–745, 2006.
- [46] Torchilin V. P. *Recent Advances with Liposomes as pharmaceutical Carriers*. *Drug Discovery*, 4:145–160, 2005.
- [47] Entius C. et al. *Influence of Formaldehyde/phenol Fixation on MRI of the Stifle Joint and Correlation with Plastinated Slices*. *Journal of the International Society for Plastination*, 19:26–32, 2004.
- [48] Chow A. M. et al. *In Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in an Experimental Model*. *Academic Radiology*, 18:246–252, 2011.
- [49] Suetens P. *Fundamentals of Medical Imaging*. Cambridge University Press, 2002.
- [50] Gregoriadis G. *Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques, Third Edition*. Informa Healthcare, 2006.
- [51] Singh N. et al. *Potential toxicity of Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)*. *Nano Reviews*, 1-15:246–252, 2010.
- [52] Júnior E. M. F. *Produção de intermediários reativos de oxigênio em arroz, na presença de alumínio*. Dissertação para obtenção do título *Magister Scientiae*, Universidade Federal de Viçosa, 2007.



Anexos



ROI's seleccionadas

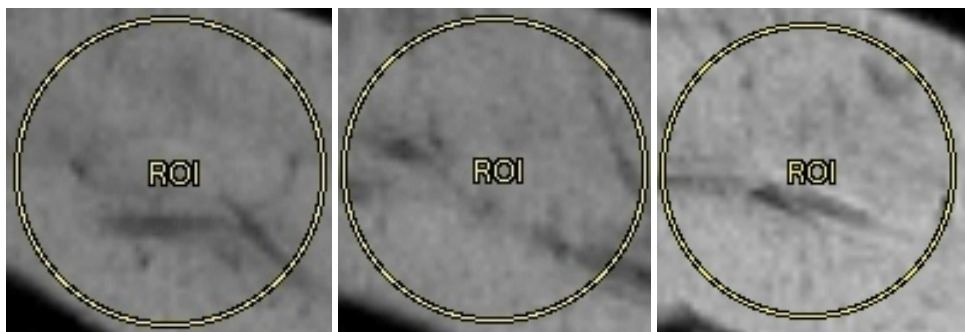


Figura A.1: ROI no caso A, corte 8, 9 e 10 respectivamente

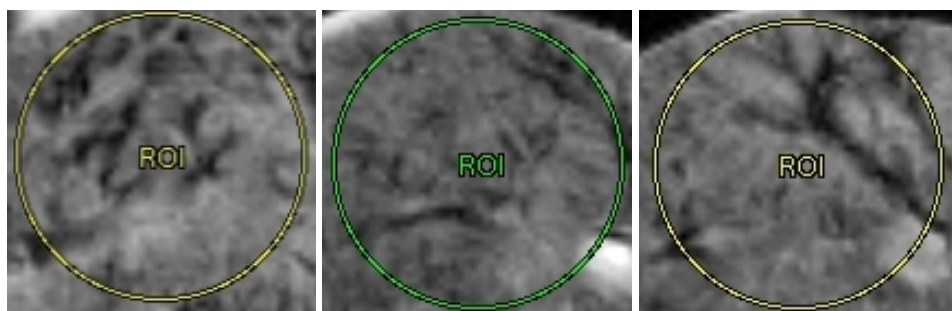


Figura A.2: ROI no caso B, corte 8, 9 e 10 respectivamente

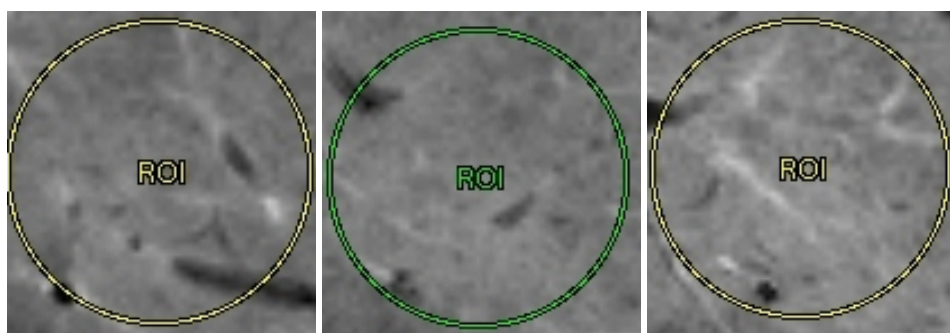


Figura A.3: ROI no caso C, corte 8, 9 e 10 respectivamente

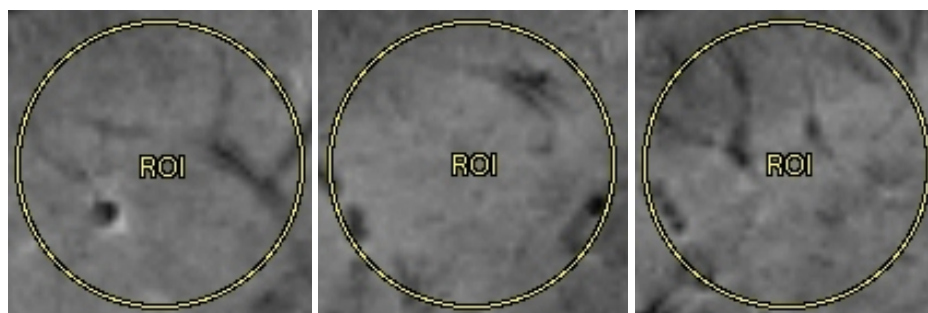


Figura A.4: ROI no caso D, corte 8, 9 e 10 respectivamente

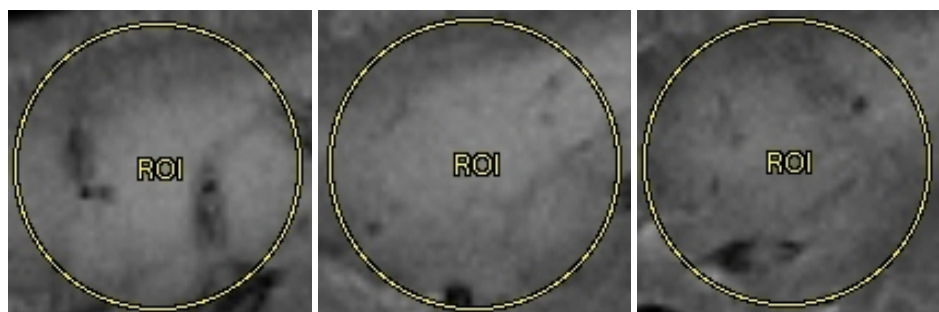


Figura A.5: ROI no caso E, corte 8, 9 e 10 respectivamente